

**ZUR EXTRAKTION VON SOJAPROTEIN UND
AUFGESCHLOSSENEM MILCHEIWEISS AUS
ERHITZTEN FLEISCH - ERZEUGNISSEN**

RICHARD ROIDER

*Kiss
Linchen
21*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0003

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der
Lebensmittel tierischen Ursprungs der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Priv.Do. Dr.med.vet.Dr.med.vet.habil. Ch. Ring

ZUR EXTRAKTION VON SOJAPROTEIN UND AUFGESCHLOSSENEM
MILCHEIWEISS AUS ERHITZTEN FLEISCH-ERZEUGNISSEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Richard Roider
aus
Furth im Wald

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. Ch. Ring
Korreferent: Prof. Dr. D. Giesecke

Tag der Promotion: 27. Juli 1984

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	<u>Fremdeiweiße</u>	2
2.1.1	Definition des Begriffes "Fremdeiweiß"	2
2.2	<u>Handelsformen von Sojaprodukten und aufgeschlossenem Milcheiweiß</u>	3
2.2.1	Sojaprodukte	3
2.2.1.1	Sojamehle	3
2.2.1.2	Sojabohnenkonzentrate	3
2.2.1.3	Sojaproteinisolate	4
2.2.1.4	Texturiertes Sojaprotein	4
2.2.2	Aufgeschlossenes Milcheiweiß	4
2.3	<u>Chemische und physikalische Eigenschaften von reinem Sojaeiweiß und von Kasein</u>	6
2.3.1	Sojaeiweiß	6
2.3.2	Kasein	8
2.4	<u>Technologische Eigenschaften</u>	10
2.5	<u>Denaturierung von Proteinen</u>	11
2.6	<u>Nachweisverfahren für Fremdeiweiße</u>	13
2.6.1	Histochemische, physikalische und biochemische Methoden	13
2.6.1.1	Sojaeiweißnachweis	13
2.6.1.2	Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß	14
2.6.2	Serologische Verfahren	15
2.6.2.1	Präzipitation	15

	Seite
2.6.2.1.1 Ringtest	15
2.6.2.1.2 Agar-Gel-Diffusionstest	16
2.6.2.1.3 Immunelektrophorese	17
2.6.2.1.4 Immunofluoreszenz	18
2.6.3 Direkte und Indirekte Hämagglutination	19
2.7 <u>Extraktionsverfahren für Fremdeiweiße</u>	21
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN	23
3.1 <u>Chemische Analyse der verwendeten Fremdeiweiße</u>	23
3.1.1 Material und Methodik	23
3.1.1.1 Bestimmung des Wassergehaltes	23
3.1.1.2 Bestimmung des Aschegehaltes	23
3.1.1.3 Bestimmung des Fettgehaltes	23
3.1.1.4 Bestimmung des Rohproteins	24
3.1.2 Ergebnisse	24
3.1.2.1 Sojaisolat "Isola PD"	24
3.1.2.2 Aufgeschlossenes Milcheiweiß "Gervita S"	24
3.2 <u>Modellwürste</u>	25
3.2.1 Brühwurst (Typ Lyoner)	25
3.2.2 Kochwurst (Typ Leberwurst, feinzerkleinert)	26
3.3 <u>Untersuchungen</u>	27
3.3.1 Agar-Gel-Diffusion (OUCHTERLONY)	27
3.2.2 Indirekte Hämagglutination (IH)	27
3.3.2.1 Aufbereitung des Probenmaterials	31
3.3.2.2 Versuche zur Extraktion der Fremdeiweiße	31
3.3.2.3 Material und Methodik	32
3.3.2.3.1 Spezifische Antisera	32
3.3.3 Gesamteiweißbestimmung mittels Biuret-Reaktion	34

3.3.3.1	Vergleich der Biuret- mit der Kjeldahl-Methode	35
3.4	<u>Vorversuche</u>	36
3.4.1	Einfluß des pH	36
3.4.1.1	Ergebnisse	36
3.4.2	Einfluß der Temperatur	37
3.4.2.1	Ergebnisse	37
3.4.3	Einfluß der Extraktionsmittelmenge	37
3.4.3.1	Ergebnisse	38
3.5	<u>Hauptversuche</u>	39
3.5.1	Extraktion von Fremdeiweiß aus den Modell-Brühwürsten	39
3.5.1.1	Bisher übliche Extraktionsmittel	39
3.5.1.1.1	Kochsalzlösungen	39
3.5.1.1.2	Harnstofflösungen	40
3.5.1.1.3	Veronalpuffer (pH 8,6)	40
3.5.1.2	Andere Extraktionsmittel	40
3.5.1.2.1	Extraktionsmittel mit Zusatz von 2-Mercaptoethanol	40
3.5.1.2.2	Extraktionsmittel mit Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS)	41
3.5.1.2.3	Extraktionsmittel mit Zusatz von Guanidiniumchlorid	42
3.5.1.2.4	Extraktionsmittel mit Zusatz von Mercaptoethanol und Guanidiniumchlorid	42
3.5.2	Extraktion von Milcheiweiß aus den Modell-Kochwürsten	43
3.5.2.1	Extraktion mit Harnstofflösung 6 mol/l	44
3.5.2.2	Extraktion mit einer Lösung von 6 mol Harnstoff, 0,012 mol Mercaptoethanol und 0,052 mol Guanidiniumchlorid pro Liter	44
3.5.2.2	Extraktion mit Veronalpuffer (pH 8,6)	45

3.5.2.4	Extraktion mit einer Lösung von 0,052 mol Guanidiniumchlorid und von 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter	45
3.5.2.5	Extraktion mit Natriumdodecylsulfatlösung 0,0034 mol/l	46
3.5.2.6	Extraktion mit Guanidiniumchloridlösung 4 mol/l	47
3.5.3	Agar-Gel-Diffusion	48
3.5.3.1	Qualitativer Nachweis von Sojaprotein in Modell-Brühwürsten	48
3.5.3.2	Qualitativer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Modell-Brühwürsten	49
3.5.3.3	Qualitativer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Modell-Kochwürsten	50
4	DISKUSSION	51
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	SUMMARY	59
7	TABELLEN	60
8	LITERATURVERZEICHNIS	99

In der Bundesrepublik Deutschland und den anderen EG-Staaten werden Fremdeiweiße (2.2.1) den Fleisch-Erzeugnissen in unterschiedlicher Art und Menge zugesetzt. Ihr Zusatz wird vor allem mit guten technologischen Eigenschaften begründet. Eine wesentliche Motivation ist jedoch auch der niedrige Preis gegenüber Fleischiweiß und dies bei ebenfalls hoher physiologischer Wertigkeit.

Der Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in Fleisch-Erzeugnissen setzt u.a. deren quantitative Extraktion voraus, was deshalb schwierig ist, weil bestimmte Herstellungsverfahren die Fleisch-Erzeugnisse so verändern, daß die Extraktion der Fremdeiweiße sehr erschwert oder sogar unmöglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nach dem Studium der Extraktion von Sojaprotein und aufgeschlossenem Milcheiweiß aus erhitzten Fleisch-Erzeugnissen neue Extraktionsmittel vorgeschlagen und in qualitativen und quantitativen Nachweisen mittels Agar-Gel-Diffusion (74), 75) und modifizierter Indirekter Hämagglutination (IH) (83) auf ihre Wirksamkeit geprüft werden.

Da die Wertigkeit der Fremdeiweiße in Wirklichkeit doch nicht ganz der des Muskeleiweißes entspricht und der Verbraucher in Fleisch-Erzeugnissen vor allem Muskeleiweiß erwartet, haben die Legislativen der EG-Staaten die Verwendung der Fremdeiweiße bei der Herstellung von Fleisch-Erzeugnissen qualitativ und quantitativ limitiert, leider nicht einheitlich. Aufgabe der Analytik ist es, die Einhaltung der einschlägigen Vorschriften zu überwachen.

2 LITERATUR

2.1 Fremdeiweiße

2.1.1 Definition des Begriffes "Fremdeiweiß"

Nach 1.74 der Leitsätze für Fleisch und Fleisch-Erzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches ist Fremdeiweiß "Eiweiß, das nicht von Schlachttierteilen stammt, z.B. Eiklar, Milcheiweiß, Sojaeiweiß, Weizeneiweiß".

2.2 Handelsformen von Sojaprodukten und aufgeschlossenem Milcheiweiß

2.2.1 Sojaprodukte

2.2.1.1 Sojamehle

Sojamehle werden aus gemahlenden Sojabohnen hergestellt, die ca. 36,4 % Roheiweiß, 18,4 % Rohfett, 25 % N-freie Extraktstoffe, 5,3 % Rohfaser, 4,9 % Rohasche und 10 % Wasser enthalten (119).

Sojamehle enthalten in der Trockenmasse zwischen 40 und 55 % Eiweiß. Der Gehalt an Fett schwankt je nach Produkt (entfettet, fettarm, wiederaufgefettet, vollfett) zwischen 1 und 20 %, der Gehalt an Kohlehydraten beträgt etwa 30 %. (79)

Sojamehl und Sojagrieß werden zwar unterschiedlich behandelt und für verschiedene Zwecke (z.B. als Zutat in Backwaren oder als Hundefutter) angeboten, die Endprodukte unterscheiden sich aber nicht wesentlich, beides sind gemahlene, entfettete Flocken. Sojagrieß ist etwas gröber (Siebgröße > 100), Sojamehl etwas feiner (Siebgröße < 100) gemahlen (79).

2.2.1.2 Sojabohnenkonzentrate

Sojabohnenkonzentrate, deren Proteingehalt nicht unter 70 % liegen soll, werden aus entfetteten Flocken mittels drei unterschiedlicher Extraktionsprozesse hergestellt. Im Rahmen der Herstellungsprozesse wird in nativem Zustand vorliegendes Ausgangsmaterial mit 60-80 %igem Alkohol oder mit angesäuertem Wasser (pH 4,6 = Isoelektrischer Punkt) gewaschen (114). Bei hitzebehandeltem wasserunlöslichem Sojaprotein als Ausgangsprodukt werden die Nichtprotein-Verbindungen mit Wasser ausgewaschen. Sojaproteinkonzentrate enthalten noch etwa 20 % Kohlehydrate.

2.2.1.3 Sojaproteinisolate

Sojaproteinisolate, die in der Trockenmasse 90-97 % Protein (mindestens 90 %) enthalten sollen, werden ebenfalls aus entfetteten Sojaflocken gewonnen. Fette fehlen in Sojaisolaten vollständig, Kohlehydrate sind nur noch in geringen Mengen vorhanden.

2.2.1.4 Texturiertes Sojaprotein

Texturiertes Sojaprotein wird aus Sojamehlen oder -proteinisolaten hergestellt, die durch Säure- oder Hitze-koagulation strukturiert und in diesem Zustand verarbeitet werden. Entsprechend dem Ausgangsmaterial enthalten texturierte Sojamehle 50-55 %, Sojaproteinisolate 90 % Eiweiß in der Trockenmasse. Wird das im alkalischen Medium gelöste Sojaproteinisolat vor der Koagulation im Säurebad z.B. durch Spinndüsen gepreßt, entstehen Fasern, die gebündelt zu kaubaren Fleischimitationen verarbeitet werden (114).

2.2.2 Aufgeschlossenes Milcheiweiß

Das für eine Verwendung auf dem Fleischsektor zugelassene aufgeschlossene Milcheiweiß (Kaseinat) wird durch Aufschluß von Kasein mit den Natrium-, Kalzium- und Kaliumverbindungen der Kohlen- oder Zitronensäure hergestellt, auf pH 7 eingestellt und dann getrocknet. Sprühgetrocknetes Kaseinat wird z.B. Backwaren zur Proteinanreicherung zugesetzt. Walzengetrocknetes Kaseinat wird für die Herstellung von Fleisch- und Fisch-Erzeugnissen verwendet. Seine chemisch-analytischen Mindest- und Höchstwerte sind in Anlage 1 der VO über Milcherzeugnisse festgelegt und in der folgenden Tabelle aufgelistet. Daneben sind Durchschnittswerte angegeben, die RUND (87) bei im Handel befindlichem aufgeschlossenem Milcheiweiß (aME) ermittelt hat.

Analysenwerte

	nach VO über Milcherzeugnisse	nach RUND (87)
Eiweiß	mind. 87 %	88 %
Fett	max. 1,5 %	1 %
Wasser	max. 6 %	5 %
Asche	max. 5 %	-
Milchzucker	max. 0,5 %	0,5 %

2.3 Chemische und physikalische Eigenschaften von reinem Sojaweiß und von Kasein

2.3.1 Sojaweiß

Reines Sojaweiß besteht nach Untersuchungen von WOLF (116) aus folgenden Fraktionen:

Anteil in Gew.-%	Bezeichnung	Molekulargewicht
22	Trypsininhibitoren	8000 - 21500
	Cytochrom c	12000
	2,3 S Globulin	18200
	2,8 S Globulin	32000
	Alantoinase	50000
37	β -Amylase	61700
	Hämagglutinine	110000
	Lipoxygenase	108000
	7 S Globulin	186000 - 210000
31	11 S Globulin	350000
11	- - -	600000

80-90 % des Sojaproteins sind Globuline. Daneben wurde auch noch ein albuminähnliches Protein ("Legumelin") ermittelt (73).

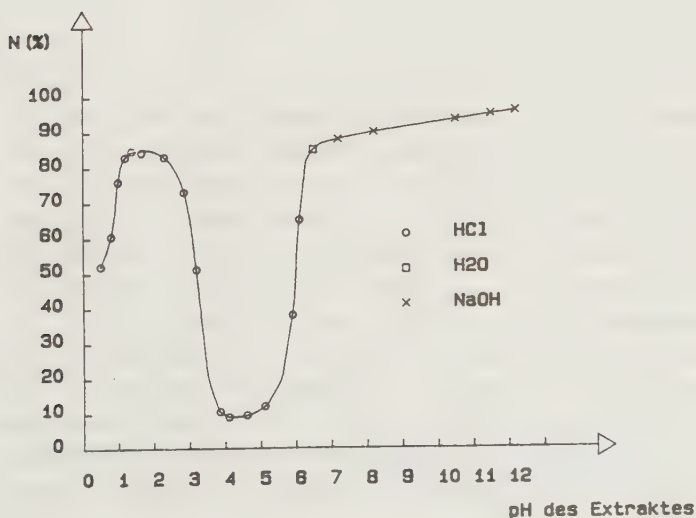
Die Aminosäurezusammensetzung des Sojaproteins scheint nicht nur für dessen hohe physiologische Wertigkeit von Bedeutung zu sein, sondern auch für die günstigen technologischen (2.4) und für die serologischen Eigenschaften. So soll z.B. Cystein, von dem etwa 1 % im Sojaprotein enthalten ist, für den Koagulationsprozeß bedeutsam (114) sein. Tyrosin, von dem Sojaprotein etwa 4 % enthält, erhöht die Immunogenität.

Eine Erhöhung des Tyrosingehaltes, z.B. durch Koppelung von Tyrosinresten an ein Protein, steigert die Immunogenität des Proteins. Diese Wirkung wird darauf zurückgeführt, daß der Tyrosinrest die gegenseitige Lage benachbarter Teile des Moleküls stabilisiert und auf diese Weise die möglicherweise labile Konfiguration von potentiell determinanten Gruppen schärfer ausprägt (50).

Sojaprodukte, wie Sojamehl, die noch Begleitstoffe enthalten (z.B. unvergärbare Zucker, Rohfaser), können in Gemischen über diese Bestandteile chemisch nachgewiesen werden, sofern solche Begleitstoffe nicht auch von anderen Zusätzen stammen können.

Nach WOLF (116) ist die Extrahierbarkeit der stickstoffhaltigen Verbindungen aus Sojamehl bei pH 2 und im alkalischen Bereich optimal, bei pH 3-6 extrem niedrig. Dies gilt allerdings nur für Sojaprodukte, die bei ihrer Gewinnung nur geringer Hitzeeinwirkung ausgesetzt waren.

Abb. 1: Extrahierbarer Stickstoff (N) aus Sojamehl in Abhängigkeit vom pH (116)



Sojaproteinisolate sind nach WOLF (116) in einem Puffer von pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,5 nur teilweise löslich. Dabei schwankt die Löslichkeit je nach Herstellungsweise der Isolate zwischen 37 und 73 %. Durch Zusatz von Mercaptoethanol (0,01 mol/l) kann die Löslichkeit auf 66-78 % erhöht werden. WOLF erklärt den relativ hohen Anteil an nicht löslichem Protein damit, daß einzelne Fraktionen des Proteins bereits in nativem Zustand als Polymere vorliegen, die durch Disulfidbindungen verknüpft sind. Bei der Gewinnung des Sojaproteins sind diese Polymere im Extraktionsprozeß noch löslich; beim Fällungsvorgang im Säurebad polymerisieren diese Proteinfractionen jedoch weiter und werden unlöslich. Reduzierende Agentien wie Mercaptoethanol sprengen vorhandene Disulfidbindungen und stellen die Löslichkeit bis zu einem gewissen Grad (bis 78 %) wieder her.

Nach NASH und WOLF (70) ist die geringe Löslichkeit auf denaturierende Reaktionen bei der Fällung am Isoelektrischen Punkt zurückzuführen. Die Löslichkeit der handelsüblichen Sojaproteinisolate ist somit weitgehend von der Prozeßführung bei der Herstellung abhängig.

2.3.2 Kasein

Kasein ist ein Phosphoproteid mit einem Molekulargewicht von ≈ 30.000 . Sein Isoelektrischer Punkt liegt bei 4,6-4,7. Es besteht aus 75 % α -Kasein (44) und 22 % β -Kasein (5, 51). α - und β -Kasein lassen sich aufgrund ihres unterschiedlichen Isoelektrischen Punktes (α -Kasein pH 4,2, β -Kasein pH 4,9) bei geeigneten Temperaturen (2 bzw. 20 °C) leicht trennen (51). Durch Aufschluß des Kaseins mit Na-, K- und Ca-Salzen der Kohlen- und Zitronensäure wird Kasein in lösliches Kaseinat übergeführt. Als Phosphoproteid löst sich Kasein leicht in Alkalien und kann aus solchen Lösungen durch pH-Senkung wieder ausgefällt werden. In starken Säuren

löst es sich kaum, in reinem Wasser praktisch nicht.
Gelöstes Kasein kann wieder ausgefällt werden (5).

2.4 Technologische Eigenschaften

Fremdeiweiße werden bei der Herstellung von Fleisch-Erzeugnissen wegen positiver technologischer Eigenschaften verwendet.

Bei der Herstellung von Brüh- und Kochstreichwürsten unterstützen sie vor allem die Emulgierung der Fette. Bei direktem Zusatz können Milch- und Sojaweiß außerdem durch Einengung des Lösungsraumes auch infolge der Bindung von freiem Wasser die Ionenkonzentration im Lösungsraum erhöhen und damit als Kutterhilfsmittel wirken. Schließlich führt der Zusatz trockener Fremdeiweiße zur direkten Wasserbindung und in der Summe aller Effekte kommt es zu geringerem Geleeabsatz. Im Gegensatz zu aufgeschlossenem Milcheiweiß, das selbst nicht zu einer zusammenhängenden Koagulation befähigt ist, unterstützt Sojaprotein das gelöste, fibrilläre Muskeleiweiß auch aktiv beim Einschluß von Fett und Wasser und bei der Koppelung größerer Fleisch- und Fetteilchen (59, 60).

2.5 Denaturierung von Proteinen

Nach KARLSON (53) ändern Proteine bei der Denaturierung vor allem ihre Struktur, wobei biologische Eigenschaften, z.B. Enzym- oder Hormonwirkung, verloren gehen. Gleichzeitig ändern sich auch ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften; so nimmt z.B. ihre Löslichkeit ab.

Eiweißdenaturierung ist meist irreversibel, unter bestimmten Bedingungen kann sie jedoch reversibel sein (17, 64).

Die Ursachen der Denaturierung können vielfältig sein. So wirken z.B. physikalische Einflüsse (Hitze, Bestrahlung, Druck) oder chemische Behandlungen (Alkohol, Guanidin oder Harnstoff u.a.) in Abhängigkeit von Intensität oder Konzentration mehr oder weniger stark denaturierend auf Proteine. In erster Linie werden dabei Sekundär- und Tertiärstrukturen sowie Faltungs- und Spiralanordnungen der Proteinmoleküle verändert (51).

Nach DITMER (15) werden bei der Denaturierung die Peptidbindungen, nicht jedoch die Wasserstoff- und Schwefelbindungen angegriffen. HAUROWITZ (28) betrachtet die Denaturierung als einen über zwei oder mehrere Zwischenstufen verlaufenden Vorgang, bei dem die Peptidstruktur offenbar zuerst umgelagert wird. Danach polymerisieren die Eiweißmoleküle oder bilden Komplexe mit den in der Lösung vorhandenen Wassermolekülen.

Nach BELITZ und SCHORMÜLLER (3) führt die Denaturierung biologisch aktiver Proteine zu einem Aktivitätsverlust und zum Verlust der serologischen Spezifität. Für vollständigen Verlust der serologischen Spezifität ist die totale Denaturierung der Proteine Voraussetzung. Durch Hitzeeinwirkung koagulierte Proteine sind in Wasser und verdünnten Salzlösungen unlöslich, in Säuren und Alkalien oder mittels bestimmter hydrotroper Substanzen jedoch löslich.

Nach BLIX et al. (5) neigen Phosphoproteide kaum zur Denaturierung. ROULET et al. (86) bezeichnen die Kaseine sogar als "undenaturierbar". JENNESS und PATTON (51) berichten, daß Kasein durch Hitzebehandlung (60-100 °C, bis zu 5 Std.) nicht verändert wird.

2.6 Nachweisverfahren für Fremdeiweiße

2.6.1 Histochemische, physikalische und biochemische Methoden

2.6.1.1 Sojaeiweißnachweis

MIERMEISTER (67) schlägt den qualitativen Nachweis über die mikroskopische Bestimmung der sanduhrförmigen Trägerzellen der Sojabohne vor. Dieses Verfahren ist jedoch nur bei Zusätzen von wenig gereinigten Sojamehlen möglich.

Nach DE HOOG et al. (49) sowie nach THALACKER (103) soll die Dichtegradienten-Zentrifugation ein geeignetes Verfahren sein, um Sojaprotein in erhitzten Fleisch-Erzeugnissen nachzuweisen.

HENDREY (36) weist Sojamehlzusätze in Fleisch-Erzeugnissen quantitativ über deren unvergärbare Zucker nach.

THALER und MALZER (108) sowie MIERMEISTER (67) ermitteln den Sojaeiweißzusatz quantitativ über die Berechnung des Rohfasergehaltes. Sojaproteinisolate, die je nach Reinheitsgrad keinen oder nur noch geringe Rohfaser- oder Zuckergehalte aufweisen, sind auf diesem Wege kaum oder überhaupt nicht nachzuweisen. Um einen erfolgreichen Sojaeiweißnachweis führen zu können, ist in den USA im Rahmen der Produktionsverfahren der Zusatz von 0,1 % Titandioxid zu Sojaproteinisolaten gesetzlich vorgeschrieben. (71)

HOMAYOUNFAR (48) beschreibt einen qualitativen elektrophoretischen Sojaproteinnachweis in hocherhitzten Fleisch-Erzeugnissen.

Mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese weisen SPELL (97) sowie HEINERT und BAUMANN (33) Sojaprotein qualitativ selbst in hocherhitzten Fleisch-Erzeugnissen nach. HELLMANNSBERGER (35) stellt diese Befunde in

Frage. Er konnte Sojaprotein nur in bis auf 70 °C erhitzten Fleisch-Erzeugnissen qualitativ nachweisen, wobei die Nachweisgrenze bei einem Zusatz von 0,5 % lag.

2.6.1.2 Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß

FEDER (18) und PELTZER (78) haben "Milcheiweiß" über Kalziumbestimmungen nachgewiesen, LINDNER und PATSCHKY (65) über begleitenden Milchzucker. Diese indirekten Nachweise sind für aufgeschlossenes Milcheiweiß nicht geeignet. KUTSCHER et al. (63) sowie THALACKER (104, 105) weisen Milcheiweiß - auch wenn es aufgeschlossen und von Begleitstoffen weitgehend befreit worden ist - quantitativ über die Ermittlung des Phosphoprotein-Phosphorgehaltes des Kaseins nach. Dabei ist ein scheinbarer Gehalt von 0,2 bis 0,3 % als Blindwert zu berücksichtigen. BAAL und LEGET (1) trennen Kasein von Fleischeiweiß elektrophoretisch. FREIMUTH und KRAUSE (21) führen den Kaseinnachweis in Fleisch-Erzeugnissen mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese durch Identifikation der α - und β -Banden des Kaseins.

Nach SPELL (97) und HELFERAD (31) sind neben Sojaprotein auch aufgeschlossenes Milcheiweiß in bis auf 120 °C erhitzten Fleisch-Erzeugnissen mittels Polyacrylamidgel-(Disk-) Elektrophorese nachweisbar. HOMAYOUNFAR (48) beschreibt den Sojaproteinnachweis mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Erzeugnissen auf Fleischgrundlage, die 24 Minuten einer Hitzebehandlung von 127 °C ausgesetzt waren.

Nach RING et al. (82) eignet sich die Polyacrylamidgel-(Disk-)Elektrophorese als spezifischer qualitativer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß und Sojaeiweiß sowie Hühnereiklar nur für bis auf 70 °C erhitzte Fleisch-Erzeugnisse.

2.6.2 Serologische Verfahren

Serologische Verfahren beruhen auf der Wechselwirkung von Antigenen und Antikörpern. In der Lebensmittelserologie werden spezifische Antikörper zum Nachweis von homologem Antigen benutzt. Grundlage ist die unsichtbare Antigen-Antikörperreaktion. Alle in der Praxis üblichen serologischen In-vitro-Methoden (Präzipitation und Agglutination) beruhen auf sekundären Auswirkungen der Bindung zwischen Antikörper und Antigen (50).

2.6.2.1 Präzipitation

Beim α -Verfahren (Antikörperkonzentration konstant, Antigenverdünnungen) wird methodisch mehr Serum benötigt als beim β -Verfahren (Antigenkonzentration konstant, Antikörperverdünnungen). Brauchbare quantitative Techniken basieren auf einer Bestimmung der Präzipitationsmenge bei optimalen Antigen-Antikörper-Proportionen (50).

2.6.2.1.1 Ringtest

Der Ringtest ist die einfachste Form der Präzipitationsreaktion. Das flüssige Antigen wird in einem Uhlenhuth-Röhrchen über das spezifische Antiserum geschichtet. An der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeiten bildet sich im Falle des Vorhandenseins eines dem Antiserum homologen Antigens eine weiße Präzipitationsscheibe. Da Antigen und Antikörper gegeneinander diffundieren, kann die Reaktion in einem weiten Konzentrationsgefälle ablaufen (50, 85).

In der Lebensmittelserologie ist diese Präzipitationsreaktion nur für klare Antigenextrakte geeignet. Der Frischzustand oder die Herstellungsweise der Fleisch-Erzeugnisse ist für die Reaktion von untergeordneter Bedeutung; das Material kann gefroren, getrocknet, gepökelt oder erhitzt worden sein.

Der Ringtest ermöglicht bei bekanntem Antiserum oder Antigen eine rasche Differenzierung des jeweiligen Reaktionspartners.

DEGENKOLB und HINGERLE (13, 14) wiesen mittels Röhrchenpräzipitation u.a. aufgeschlossenes Milcheiweiß und Sojaprotein in auf 115 °C erhitzten Fleisch-Erzeugnissen sowie Trockenblutplasma in Roh- und Brühwürsten nach. Um mit Sicherheit das gesamte Antigen im Präzipitat zu binden, wurde die Reaktion mit Antikörperüberschuß durchgeführt und nach dem Zentrifugieren das Volumen des Präzipitats gemessen. Mit dem Überstand wurde zusätzlich eine Indirekte Hämagglutination durchgeführt, um ungebundene Antikörper zu erfassen.

Nach HERRMANN (41) soll jedoch ein quantitativer Nachweis von Fremdeiweiß in Fleisch-Erzeugnissen mit dem Röhrchenpräzipitationstest nur dann möglich sein, wenn das Probenmaterial nicht über 70-75 °C erhitzt worden ist.

2.6.2.1.2 Agar-Gel-Diffusionstest

LOUDIN (76) modifizierte den Ringtest, indem er das Antiserum in Agar einbettete und die Antigenlösung überschichtete. Bei homologen Reaktionspartnern bilden sich bei diesem Vorgehen im Agar durch eine einfache Diffusion in einer Dimension Präzipitationsbanden. Aus dieser Einfachdiffusion entwickelte OUCHTERLONY (74, 75) die in der Lebensmittelüberwachung übliche Doppeldiffusion in zwei Dimensionen. Dabei werden die beiden Reaktionspartner (Antigen-Antikörper) in getrennte, aus dem Agar gestanzte Löcher pipettiert. Durch gleichzeitige Diffusion von Antigen und homologem Antiserum in optimalen Proportionen bildet sich zwischen den Löchern eine Präzipitationslinie. (50)

Bei der Auswertung wird der Abstand zwischen der Auftragstelle des Antiserums und der entstandenen Präzipitationsbande als Maß für die vorhandene Antigenmenge genommen (89). Gegen eine quantitative Auswertung der

Agar-Gel-Diffusion gaben HERRMANN et al. (42) zu bedenken, daß in der Lebensmittelserologie im Gegensatz zur Immunologie in der Regel keine gereinigten Proteine, sondern verschiedene Proteinfractionen mit unterschiedlichen Molekülgrößen und Wanderungsgeschwindigkeiten vorliegen. Daher dürfte der Bandenabstand der Eiweißkonzentration kaum proportional sein.

HERRMANN et al. (42) unterschieden mit dieser Methode Milcheiweißkonzentrationen von 1,5, 2,0, 2,5 und 3,0 % in bis auf 75 °C erhitzten Fleischwaren. Bei höher erhitztem Untersuchungsmaterial lag die Nachweisgrenze über 1,5 %. So konnten in auf 90-93 °C erhitzten Proben erst Gehalte ab 3 % erfaßt werden.

GÜNTHER (26) führte mit dieser Immundiffusion den qualitativen und quantitativen Nachweis von Sojaeiweiß und aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleisch-Erzeugnissen. Er sowie OUDIN (76) verwendeten dafür sowohl die Einfachdiffusion nach HAYWARD und AUGUSTIN (29) als auch die Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (74, 75).

2.6.2.1.3 Immunelektrophorese

Durch die Kombination einer Doppeldiffusionsmethode mit elektrophoretischer Auftrennung auf der Agarplatte können Proteine aufgrund ihrer antigenen und elektrophoretischen Eigenschaften analysiert werden. Bei dieser Methode wird parallel zur Laufrichtung des Antigens eine Rinne in den Agar gestanzt und mit homologem Antiserum gefüllt. Nach etwa einem Tag werden im Agar - je nach Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinmoleküle - Präzipitationslinien als Ausdruck der Reaktion mit dem spezifischen Antiserum sichtbar. (50)

ENOCH (16), HERRMANN und KOTTER (40) sowie HERRMANN et al. (42) sehen in der Immunelektrophorese ein Nachweisverfahren, das allenfalls eine semiquantitative Aussage über den Gehalt an Fremdeiweiß ermöglicht.

Nach SINELL (93) kann mit Hilfe der Immunelektrophorese eine annähernd quantitative Auswertung erfolgen, wenn das Vergleichsmaterial dem Untersuchungsmaterial hinsichtlich Herstellungsprozeß und Zusammensetzung entspricht.

HANSON (27) sowie WADSWORTH und HANSON (110) beschreiben die "komparative Immunelektrophorese". Dabei werden Proben bekannter Fremdeiweißkonzentration in die Untersuchung einbezogen.

2.6.2.1.4 Immunofluoreszenz

Es existieren verschiedene Modifikationen der Immunofluoreszenz-Technik (direkte, indirekte oder Doppelschichttechnik, Sandwich-Technik).

Bei der einfachsten (direkten) Anwendungsart wird ein Tropfen des Konjugats, das sind Fluorescein-Isothiocyanat-markierte spezifische Antikörper (0,1 mg : 1 mg) auf 10 μ starke Gefrierschnitte des Untersuchungsgutes, die auf Objektträger aufgezogen wurden, pipettiert. Die Färbung erfolgt in ca. 30 Minuten bei 37 °C. Überschüssige Antikörper, d.h. Antikörper, die nicht an homologes Antigen gebunden sind, werden durch mehrmaliges Waschen in NaCl-Puffer abgespült. Die so behandelten Schnitte werden in Glycerin-NaCl-Puffer eingebettet und mit Paraffin umrandet. Danach erfolgt die Untersuchung der Schnitte mit der großen Fluoreszenzleuchte für Durchlichtfluoreszenz im Standardmikroskop. Fremdeiweiß (z.B. Milcheiweiß) kann auf diese Weise als punktförmige Fluoreszenzerscheinung eindeutig nachgewiesen werden. (50)

2.6.3 Direkte und Indirekte Hämagglutination

Bereits um die Jahrhundertwende beschreiben KRAUS und LUDWIG (62) die Agglutination von Erythrozyten durch "direkte" Einwirkung eines mikrobiellen Antigens. Auf der Basis dieser Entdeckung hat die Hämagglutination in Bakteriologie und Virologie als verhältnismäßig einfache und dennoch empfindliche Nachweismethode große Bedeutung erlangt.

KEOG et al. (55) entdeckten, daß bakterielle Antigene von Erythrozyten adsorbiert werden und bei Kontakt mit spezifischen Antiseren agglutinieren. Diese Reaktion wurde als "Indirekte Hämagglutination" bezeichnet.

Nachdem es BOYDEN und GRABAR (7) gelungen war, die Sensibilisierung der mit Tannin aufgerauhten Erythrozyten auch mit Protein durchzuführen, konnte die Indirekte Hämagglutination in der Lebensmittelserologie als quantitativer und qualitativer Nachweis verwendet werden (37). Die Antikörper reagieren dabei nicht mit den Erythrozyten-Antigenen, sondern mit den adsorptiv an der Erythrozytenoberfläche gebundenen Proteinen.

In der Regel werden Hammel-Erythrozyten verwendet, daneben sind auch Erythrozyten von Kaninchen, Meer-schweinchen, Hühnern und Mäusen brauchbar. (111)

Während die Empfindlichkeit bei der Präzipitation durch die sichtbare Menge des Antigen-Antikörper-Komplexes stark begrenzt ist, liegt sie bei der Indirekten Häm-agglutination aufgrund der Indikatorwirkung der Erythrozyten um ein Vielfaches höher. Ein Immunserum, das nur bis zu einer Verdünnung von 1 : 10 eine Präzipitationsreaktion zeigt, kann noch bei 1000-facher Verdünnung eine Agglutination hervorrufen (50).

Nach STAVITSKY (100) ist die Indirekte Hämagglutination zumindest zehnmal empfindlicher und spezifischer als die Präzipitation.

HERRMANN und KOTTER (40) wiesen mit der Indirekten Häm-agglutination Hühnereiweiß ab 1,0 %, aufgeschlossenes Milcheiweiß ab 0,1 % und Sojaeiweiß ab 0,2 % in hoch-erhitzten Fleischwaren nach.

WAGENSTALLER (111) hat mit dieser Methode 1972 "Soja-protein" in auf 115 °C erhitzter Brühwurst noch quanti-tativ und in auf 121 °C erhitzter Brühwurst noch quali-tativ nachgewiesen.

KOTTER et al. (57) gelang mittels der Indirekten Häm-agglutination der quantitative Nachweis von aufgeschlos-senem Milcheiweiß ab 0,1 % in bis auf 115 °C erhitzten Fleischwaren.

ENOCH (16) differenzierte unterschiedlich hohe Trocken-blutplasmakonzentrationen (1,5, 2,0, 2,5 und 3,0 %) bei bis auf 110 °C erhitzten Wurstwaren.

KLUGE-WILM (56) kam zu anderen Ergebnissen als HERRMANN et al. (36) sowie KOTTER et al. (57). Sie erhielt für aufgeschlossenes Milcheiweiß bei Zusätzen zwischen 0,25 und 4 % nur regellose Titerabschwächungen; sie ließen keinen Zusammenhang mit der Menge des zugesetzten Milcheiweißes erkennen. Die gleichen Ergebnisse er-zielten DEGENKOLB und HINGERLE (13, 14). Außerdem hielten sie (13, 14, 56) den Aufwand zur Durchführung der Indirekten Hämagglutination für entbehrlich, da bereits durch einfache Präzipitationsreaktionen genaue Gehalte an Fremdeiweiß festzustellen seien, mittels Indirekter Hämagglutination jedoch höchstens Annähe-rungswerte.

HERRMANN et al. (42, 43) sowie RING und SACHER (84) bestätigten vorausgegangene Untersuchungen und gaben Fehlerquellen bei der Durchführung der Indirekten Hämagglutination sowie Möglichkeiten zu deren Verhinde-rung an.

2.7 Extraktionsverfahren für Fremdeiweiß

JÜBERMANN (52) bezeichnet "Extraktion" als ein Verfahren, durch das eine Substanz oder eine Substanzgruppe aus einem Gemisch oder einer Lösung mit einem selektiv wirkenden Lösungsmittel herausgelöst wird.

Die Verfahren zur Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleisch-Erzeugnissen unterscheiden sich hinsichtlich Lösungsmittel, pH-Wert, Extraktionsmittel- und Probenmenge, Extraktionsdauer und -temperatur wie auch hinsichtlich der Vorbehandlung des Untersuchungsgutes (Zerkleinerung, Lyophilisation).

WAGENSTALLER (111) extrahierte 1972 lyophilisiertes Probenmaterial einer sojaeiweißhaltigen Modellwurst mittels Veronalpuffer bei pH 8,6 im Verhältnis 1 : 5 über 2 Stunden bei 37 °C, danach wurde 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand über einen Faltenfilter dekantiert.

HERRMANN (37) hält das Lyophilisieren des zu untersuchenden Materials bei hocherhitzten Fleisch-Erzeugnissen für unerlässlich, da dadurch ein schwammartiges Netz aus Proteinen entsteht. Die daraus resultierende Oberflächenvergrößerung soll zu einer besseren Löslichkeit der Proteine führen.

Natrium-Dodecylsulfat (SDS) wird nach HOFMANN und PENNY (46) mit Erfolg zur Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleisch-Erzeugnissen angewandt.

Nach GERIGK und KRÜGER (24), KLUGE-WILM (56) sowie DEGENKOLB und HINGERLE (13, 14) wird das Ergebnis der Extraktion durch Lyophilisieren des Probenmaterials nicht verbessert.

KOTTER und HERRMANN (57) sowie HERRMANN (37) versetzten lyophilisiertes fremdeiweißhaltiges Untersuchungsmaterial im Verhältnis 1 : 2 mit physiologischer Kochsalzlösung und extrahierten 48 Stunden bei 0-4 °C.

DEGENKOLB und HINGERLE (14) extrahierten das zerkleinerte Probenmaterial mittels physiologischer Kochsalzlösung bei pH 7,5-8,0 über 2 Stunden bei 40 °C. Die Lösungsmittelmenge ergab sich aus der Formel $5x(4a + 16b + 10)$, wobei a der fettfreien Trockenmasse, b dem Fettgehalt entsprach. Nach erfolgter Extraktion wurde nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 4.000 U/min der Überstand abgesaugt.

SINELL und MENTZ (95) verwendeten zur Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleisch-Erzeugnissen Harnstofflösungen (6-7 M), z.T. mit Zusatz von Mercaptoethanol. Zentrifugiert wurde bei 10.000 U/min und der Extrakt durch Abgießen über ein Faltenfilter gewonnen.

RING und SACHER (84) erreichten durch eine auf pH 8,5 eingestellte NaCl-Lösung, der 1 % Harnstoff und 0,7 % Mercaptoethanol zugesetzt worden waren, bei der Extraktion von Sojaweißisolaten aus hochoerhitzten Fleisch-Erzeugnissen bessere Ergebnisse als mit den o.a. Lösungsmitteln.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Chemische Analyse der verwendeten Fremdeiweiße

3.1.1 Material und Methodik

Untersucht wurden das Sojaprotein "Isola PD" - nach Herstellerangabe "reinstes pflanzliches Eiweiß, das nur 1 % Fettbestandteile aufweist", und das bei der serologischen Eiweißdifferenzierung ausschließlich mit Antisojaserum reagiert - sowie das aufgeschlossene Milcheiweiß "Gervita S".

Die Wasser- und Aschegehalte wurden in Anlehnung an die Amtliche Sammlung der Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG ermittelt.

3.1.1.1 Bestimmung des Wassergehaltes

5 g Probe wurden in ein Porzellanschälchen eingewogen und im Trockenschrank bei 103 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Wassergehalt wurde aus der Gewichts-differenz zwischen Einwaage und getrockneter Substanz nach dem Abkühlen im Exsikkator errechnet.

3.1.1.2 Bestimmung des Aschegehaltes

5 g Probe wurden in einen Porzellantiegel eingewogen und im Muffelofen zunächst bei 300 °C vorgetrocknet und dann ca. 12 Stunden bei 550 °C bis zur vollständigen Veraschung geglüht.

3.1.1.3 Bestimmung des Fettgehaltes

Der Fettgehalt wurde nach SOXHLET bestimmt.

3.1.1.4 Bestimmung des Rohproteins

Der Rohproteingehalt wurde nach der Methode L 06.00 - 7 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG "Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen" ermittelt.

Zur Überprüfung von Präzision und Richtigkeit wurden von einer Kontrollprobe mit einem definierten Rohprotein-gehalt von 20,0 g/100 g fünf Bestimmungen durchgeführt:

Untersuchung	Rohproteingehalt (Nx6,25)
Nr.	g/100 g
1	19,87
2	19,92
3	20,03
4	19,84
5	20,10

$$\bar{x} = 19,95 \text{ g/100 g}$$

$$s = \pm 0,109 \text{ g/100 g}$$

$$VK = 0,55$$

maximale Differenz zwischen
Ist- und Sollwert 0,16 g/100 g

Das Wiederholbarkeitskriterium ($r = 0,35 \text{ g/100 g}$) und das Vergleichbarkeitskriterium ($R = 0,6 \text{ g/100 g}$) der Methode L 06.00 - 7 der Amtlichen Sammlungen sind erfüllt.

3.1.2 Ergebnisse

3.1.2.1 Sojaisolat "Isola PD"

Wasser	5,8 g/100 g Probe
Asche	3,6 "
Fett	0,5 "
Rohprotein (Nx6,25)	84,2 "

3.1.2.2 Aufgeschlossenes Milcheiweiß "Gervita S"

Wasser	7,7 g/100 g Probe
Asche	3,8 "
Fett	0,4 "
Rohprotein (Nx6,37)	86,0 "

3.2 Modellwürste

3.2.1 Brühwurst (Typ Lyoner)

Grundrezeptur

- 25 % Rindfleisch (R II)
- 25 % Rindfleisch (R III)
- 25 % Rückenspeck (S VIII)
- 25 % Eis

Bezogen auf die Fleisch- und Fettmenge wurden 2 % Nitritpökelsalz sowie 0,3 % Diphosphat und, bezogen auf das Gesamtbrät, 0,03 % Natriumascorbat und 0,4 % einer Gewürzmischung zugesetzt.

Aus diesem Grundbrät, das gleichzeitig als Kontrollcharge diente, wurden 2 Chargen mit folgenden Fremdeiweißzusätzen hergestellt:

- a) pro 100 g Brät wurden 1,5 g "Isola PD" (= 2 % bezogen auf die Fleisch- und Fettmenge) eingekuttert
- b) pro 100 g Brät wurden 1,5 g "Gervita S" (= 2 % bezogen auf die Fleisch- und Fettmenge) eingekuttert.

Das Brät wurde in gefärbten, innenbeschichteten Cellulosefaserdärmen (Kaliber 55 mm) 30 Minuten lang auf 70 °C Kerntemperatur erhitzt. Die Würste wurden nach dem Abkühlen bei -14 °C gelagert.

Für den quantitativen Nachweis besteht wegen mengenbeschränkter Zulassungen scheinbar nur bei Milcheiweiß Veranlassung. Bei Sojaprotein besteht jedoch wegen dessen technologischer Wirkung ein besonderer Anreiz zur illegalen Verwendung bei Brühwurst, und weil bei Beanstandungen gelegentlich die Frage nach der Erheblichkeit gestellt und eine Wertminderung bestritten wird - (nicht Muskeleiweiß, sondern Fett und Wasser seien durch Fremdeiweiß verdrängt worden), wurde bei Brühwurst auch die quantitative Extraktion von Sojaprotein studiert.

3.2.2 Kochwurst (Typ Leberwurst, feinzerkleinert)

Grundrezeptur

25 % Schweineleber (frisch)

25 % Schweinehals (S II)

50 % Schweinebauch ohne Schwarten (S IV)

Bezogen auf das Gesamtbrät wurden 1,8 % Nitritpökelsalz, 0,4 % Gewürzmischung, 0,1 % Bratzwiebelessenz, 0,1 % Umrötehilfsmittel und 0,05 % Geschmacksverstärker (Glutamat) zugesetzt.

Aus diesem Grundbrät, das gleichzeitig als Kontrollcharge diente, wurden 4 Chargen mit folgenden Fremdeiweißzusätzen hergestellt:

Pro 100 g Brät wurden 1, 2, 3 bzw. 4 g aufgeschlossenes Milcheiweiß "Gervita S" eingekuttert. Das Brät wurde in ungefärbten, innenbeschichteten Cellulosefaserdärmen (Kaliber 55 mm) 30 Minuten lang auf 70 °C oder 121 °C Kerntemperatur erhitzt. Die Würste wurden nach dem Abkühlen bei -14 °C gelagert.

3.3 Untersuchungen

3.3.1 Agar-Gel-Diffusion (OUCHTERLONY)

Der Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTERLONY (siehe 2.6.2.1.2) ist in der Praxis der Untersuchung von Fleisch-Erzeugnissen das am weitesten verbreitete serologische Nachweisverfahren.

Mittels dieses Verfahrens wurden die aus dem Untersuchungsgut durch die unterschiedlichen Lösungsmittel gewonnenen Fremdeiweiße mit dem jeweils spezifischen Antiserum bis zur Verdünnungsstufe 1 : 32 auf ihre Nachweisbarkeit geprüft.

3.3.2 Indirekte Hämagglutination (IH)

Die Indirekte Hämagglutination (2.6.3) hat sich in der Lebensmittelserologie als hochempfindliches Verfahren bewährt (57). Mit der Indirekten Hämagglutination können Fremdeiweiße qualitativ und quantitativ in rohen wie auch in erhitzten und hocherhitzten Fleisch-Erzeugnissen nachgewiesen werden. Zur ausreichenden Extraktion der nachzuweisenden Fremdeiweiße aus Fleisch-Erzeugnissen werden wirksamere Extraktionsmittel als bisher benötigt, zumal die Fremdeiweiße mit hohem Reinheitsgrad bei ihrer Produktion meist höheren Temperaturen ausgesetzt sind als früher. Extraktionsmittel, die in einer 1972 vorgelegten Arbeit (111) zur Gewinnung von zugesetztem Sojaprotein aus Fleisch-Erzeugnissen vorgeschlagen worden waren (Veronalpuffer, Kochsalz- und Harnstofflösung), haben sich nach eigenen Untersuchungen zur Extraktion gegenwärtig angebotener Sojaisolate als unzureichend erwiesen. Darüber hinaus waren bisher übliche Lösungsmittel (Veronalpuffer, Harnstofflösung) auch bei der Extraktion von Fremdeiweißen aus Kochwurst (Leberwurst) unbefriedigend.

Daraus wird ersichtlich, daß ein Versagen der IH neben unsachgemäßer Durchführung auch auf unzureichender Extraktion der Zusätze beruhen kann (s. 2.6.3).

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Extraktionsmittel wurde neben dem in der Lebensmitteluntersuchungspraxis eingeführten Agar-Gel-Diffusionstest (74, 75) die von SACHER (88) sowie von RING und SACHER (83, 84) auf der Basis der Arbeit von WAGENSTALLER (111) modifizierte Indirekte Hämagglutination verwendet. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Herstellung formalinisierten, sensibilisierter Hammelerythrozyten:

Das Hammelblut wird zu gleichen Teilen mit Alserverseher Lösung in einer Schüttelflasche aufgefangen und bis zum Erkalten zusammen mit Glasperlen sehr vorsichtig geschüttelt. Eine unsachgemäße Blutentnahme oder zu grobes Schütteln kann zu Hämolyse oder Spontanagglutination der Erythrozyten führen. Solches Blut ist für die Indirekte Hämagglutination unbrauchbar. Das Blut ist zwar bei 4 °C etwa 10 Tage haltbar, sollte aber trotzdem möglichst frisch verarbeitet werden.

Zur Konservierung der Erythrozyten werden diese zunächst bei 6.150 g abzentrifugiert und dreimal mit physiologischer NaCl-Lösung (pNaCl) gewaschen. Da bereits ein geringer Anteil an hämolytischen Erythrozyten zur fehlerhaften Auswertung der Indirekten Hämagglutination führen kann, sind sie durch Auswaschen vollständig zu entfernen. Sofern das Sediment nach dem zweiten Waschvorgang keine Zeichen einer Hämolyse zeigt, sind die Erythrozyten als tauglich anzusehen.

Nach WAGENSTALLER (111) wird anschließend eine 8 %ige Erythrozytensuspension mit der gleichen Menge einer 3 %igen Formalinlösung (pH 7,0-7,5) versetzt. Die Suspension wird auf dem Magnetrührer im Brutschrank (37 °C) mindestens 18 Stunden, höchstens 20 Stunden inkubiert.

Danach wird die Suspension ca. 5 Minuten bei 6.150 bis 10.950 g abzentrifugiert und 4mal mit pNaCl ausgewaschen.

Nach der Formalinisierung sind die Erythrozyten verhältnismäßig stabil und weniger anfällig gegen Hämolyse oder Spontanagglutinationen.

Zur Tanninbehandlung der formalinisierten Erythrozyten werden diese nach WAGENSTALLER (111) mit gepufferter pNaCl (g pNaCl) (pH 7,2) zu einer 3,3 %igen Zellsuspension verdünnt und mit der gleichen Menge Tanninlösung (Tannin : pNaCl = 1 : 40.000) versetzt. Diese Suspension wird auf dem Magnetrührer 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, abzentrifugiert und mit pNaCl, pH 6,2, zweimal ausgewaschen. Nach der Tanninbehandlung kann die weitere Behandlung der Erythrozyten unterbrochen werden.

Zur Sensibilisierung werden die tanninbehandelten Erythrozyten mit g pNaCl auf eine 3,3 %ige Zellsuspension aufgeschwemmt und zu gleichen Teilen mit 0,25 %iger Fremdeiweißlösung in g pNaCl versetzt. Der pH-Wert der pNaCl beträgt für die Herstellung der Milcheiweißlösung 6,0, für Sojaproteinisolatlösung 6,4. Das Reaktionsgemisch wird 1 Stunde im Brutschrank (37 °C) inkubiert und danach zur Entfernung des nicht absorbierten Proteins zweimal mit pNaCl gewaschen.

Die bereits im Rahmen ihrer Herstellung auf über 100 °C erhitzten Sojaproteinisolate erwiesen sich in g pNaCl (pH 6,4) als nur teilweise löslich. Der unlösliche Anteil ließ sich erst durch 12maliges Waschen weitestgehend entfernen. Dabei wurde allerdings auch der größte Teil des absorbierten Antigens wieder von den Erythrozyten abgelöst, woraus extrem hohe Titer bei der Indirekten Hämagglutination resultieren. Andererseits kam es aber aufgrund der geringen Menge des von den Erythrozyten absorbierten Antigens bei der Indirekten Hämagglutination zu unvollkommenen Agglutinationen, was die Ergebnisse in Frage stellte.

Die Sensibilisierung der tanninbehandelten, formalinisierten Erythrozyten wird deshalb vorteilhafter mit einer 0,3 %igen Antigenlösung durchgeführt, der 0,004 mol Mercaptoethanol pro Liter zugesetzt werden. Nach schonender Homogenisierung (Ultraturrax) wird das Homogenat 3 Stunden auf den Magnetrührer in den Brutschrank gestellt. Bei unvollständiger Lösung der Sojaproteinpräparate ist es erforderlich, nicht gelöste Anteile durch zweilagige Gaze abzufiltern. Das überschüssige Antigen läßt sich nach dem Inkubieren durch zweimaliges Auswaschen problemlos entfernen. Die Titer dieser formalinisierten, tanninbehandelten und sensibilisierten Erythrozyten (FSE) waren aufgrund des höheren gebundenen Antigenanteils niedriger als die Titer von FSE, die nach der von WAGENSTALLER (111) beschriebenen Methode gewonnen worden waren. Fragliche Reaktionen traten wesentlich seltener auf.

Zur Standardisierung der FSE wird die Menge der zum Verdünnen benötigten pNaCl ermittelt. Dazu wird 1 ml der 10 %igen FSE-Suspension mit pNaCl auf 0,25 % verdünnt und die optische Dichte bei 620 nm (Filter J62, Elko II) gemessen. Aus der festgestellten Extinktion (E) berechnet WAGENSTALLER (111) die benötigte Menge pNaCl wie folgt:

$$E \times 33,33 = \text{ml pNaCl.}$$

Vor der Schockfrostung bei -50°C im Gefrierbad wird die 10 %ige FSE-Suspension mit 1 % Kaninchenserum und Merthiolat (1 : 10.000) versetzt und bei -18°C gelagert. Da bei längerer Lagerung der konservierten Erythrozyten die Neigung zur Spontanagglutination zunimmt, sollte die Lagerzeit bei mit Sojaeiweiß sensibilisierten Erythrozyten 2 Monate nicht überschreiten.

3.3.2.1 Aufbereitung des Probenmaterials

Ca. 200 g des tiefgefrorenen Untersuchungsmaterials wurden mit einem Homogenisierungsgerät (Moulinette) feinkörnig zerkleinert. Um ein Verklumpen des Probenmaterials zu vermeiden, wurde das Wurstgut nach kurzzeitigem Schneidevorgang wieder gefroren und danach erneut zerkleinert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis das Material pulverförmige Struktur hatte.

3.3.2.2 Versuche zur Extraktion der Fremdeiweiße

25 g homogenisiertes Probenmaterial wurden in Zentrifugengläser eingewogen und mit dem zu prüfenden Extraktionsmittel im Verhältnis 1 : 1 versetzt, mit NaOH 1 mol/l der pH-Wert auf 6,5 eingestellt (bei Veronalpuffer pH 8,6) und 24 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C, anschließend 3 Stunden im Schüttelwasserbad bei 40 °C extrahiert.

Die so behandelte Probe wurde 10 Minuten bei 10.950 g zentrifugiert und der Überstand über Gaze (8fach) dekantiert.

Die Wirksamkeit der in die Untersuchung einbezogenen Extraktionsmittel wurde mittels Indirekter Hämagglutination geprüft.

Je Extraktion erfolgten zunächst 5 Ansätze. Zusätzliche Ansätze waren erforderlich, wenn die Ergebnisse der bis dahin durchgeführten Untersuchungen aufgrund ihrer Streuung keine befriedigende statistische Absicherung zuließen.

3.3.2.3 Material und Methodik

3.3.2.3.1 Sepzifische Antisera

Zur Gewinnung der Antisera wurden in der Regel ca. 4 kg schwere Kaninchen aus den Kreuzungen Deutscher Riese, grau, mit Großchinchilla oder Blauer Wiener immunisiert. Dazu wurden beidseits lateral der Dornfortsätze, caudal der Scapula bis in den Lendenbereich über maximal 6 Wochen bis zu 15 subkutane Injektionen von jeweils 3 ml Antigen verabreicht. Dem mit pNaCl angesetzten Antigen (10 g Antigen ad 100 ml pNaCl) wurde ein Zusatz von 0,02 mol Aluminiumhydroxid pro Liter zugemischt (81).

Zur Gewinnung von spezifischen Antisera gegen Fremdeiweiße, die im Rahmen ihrer Herstellung oder ihrer Verarbeitung erhitzt oder hocherhitzt worden waren, sind bei der Immunisierung entsprechend hocherhitzte Antigene erforderlich (13, 14, 84).

Nach Aufbereiten des Untersuchungsmaterials (s. 3.3.2.1) und Extraktion des Fremdeiweißes (s. 3.3.2.2) werden Untersuchungsextrakt und Antiserum im Verhältnis 1 : 2 angesetzt, kräftig durchgeschüttelt und bei 37 °C 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach wird das Präzipitat bei 6.150 g 5 Minuten abzentrifugiert. In die Agglutinationsröhrchen der Verdünnungsreihe (12x100 mm, mit rundem Boden) wird - abgesehen von der Antikörpertiterreihe - jeweils 0,5 ml pNaCl (pH 7,2) vorgelegt und dem 1. Röhrchen der Reihen 0,5 ml des inkubierten Antiserums zugesetzt. Der Antikörpertiterreihe werden 0,5 ml des mit dem Lösungsmittel im Verhältnis 1 : 2 verdünnten Antiserums zugesetzt. Anschließend wird vom 1. Röhrchen an durch Überpipettieren von 0,5 ml in das jeweils nächste eine geometrische Verdünnungsreihe angelegt.

Nach dem Zusatz der FSE (2 Tropfen in jedes Röhrchen) wird der Ständer mit den Agglutinationsröhrchen kräftig

geschüttelt und 30 Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach dieser Inkubation werden die Ständer mit den Röhrchen etwa 24 Stunden im Kühlschrank bei ca. 6 °C aufbewahrt.

Die Reaktion wird durch Beurteilung des Erythrozyten-sediments am Boden der Röhrchen der Verdünnungsreihe ausgewertet. Bei eingetretener Agglutination breiten sich die relativ großflächigen Erythrozytenagglutinate teppichartig über den ganzen Boden aus. Die Randzonen sind in diesem Fall ausgefranst. Je nach Reaktion wird die Agglutination mit +, ++ oder +++ symbolisiert. Sofern die Agglutination ausbleibt, sedimentieren die nicht agglutinierten Erythrozyten punktförmig auf dem Röhrchenboden oder bilden einen Ring mit glatter Randzone (3.3.2).

3.3.2.3.2 Reagenzien

Zur Extraktion der o.a. Fremdeiweiße aus erhitzten Fleisch-Erzeugnissen wurden folgende Lösungen verwendet:

NaCl-Lösungen:

8,75, 18,75, 28,75 37,5 48,75 68,75 und 97,5 g/l;

Harnstofflösungen:

1, 2, 6 und 8 mol/l;

Veronalpuffer (pH 8,6);

Guanidiniumchloridlösung 4 mol/l;

Natriumdodecylsulfatlösung 0,0034 mol/l;

8,75 g NaCl + 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter;

6 mol Harnstoff + 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter;

8,75 g NaCl + 0,0034 mol Natriumdodecylsulfat pro Liter;

6 mol Harnstoff + 0,0034 mol Natriumdodecylsulfat pro Liter;

8,75 g NaCl + 0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter;

6 mol Harnstoff + 0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter;

6 mol Harnstoff + 0,012 mol Mercaptoethanol + 0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter;

6 mol Harnstoff + 0,052 Guanidiniumchlorid + 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter;

0,052 mol Guanidiniumchlorid + 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter.

3.3.3 Gesamteiweißbestimmung mittels Biuret-Reaktion

Für die Gesamteiweißbestimmung mittels der Biuret-Reaktion ("MERCKO-Test") erwiesen sich 20 g homogenisierte Modellwürste arbeitstechnisch als vorteilhaft.

Das Material wurde in Zentrifugengläser eingewogen, im Verhältnis 1 : 1 mit dem jeweiligen Extraktionsmittel versetzt (3.4.1), 10 Minuten bei 10.950 g zentrifugiert und dann über Gaze (8-fach) abfiltriert.

4 ml Extrakt wurden mit 0,4 ml Biuret-Reagenz-Konzentrat versetzt und nach 30 Minuten die Extinktion dieser Lösung im Spektralphotometer (ZEISS-PM 6) in Makroeinküvetten (ratiolab^R) gemessen. Extraktionsmittel, die Schwefelverbindungen (z.B. Mercaptoethanol) enthalten, stören die Biuret-Reaktion. Bei mit solchen Lösungsmitteln gewonnenen Extrakten wurde keine Biuret-Reaktion durchgeführt.

Der "MERCKO-Test" eignet sich zur Bestimmung des Gesamteiweißes nur für homogene, klare Flüssigkeiten (z.B. Serum, Plasma und Liquor).

3.3.3.1 Vergleich der Biuret- mit der Kjeldahl-Methode

Ermittlung des Multiplikationsfaktors zur Berechnung des Eiweißgehaltes aus der Extinktion des Biuret-Ansatzes mit

0,4 ml Standardserum (6 g/l) + 3,6 ml Aqua dest. E_A
 0,4 ml Biuret-Reagenz

Der Multiplikationsfaktor 4,6 wurde aus dem Quotienten $\frac{6}{E_A}$ ermittelt.

Die Biuret-Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

	Eiweißgehalt in g/l			Kjeldahl
	x_i	Biuret $\bar{x}$	$\pm s$	
1 % Milcheiweiß in pNaCl	5,15	6,67	1,74	9,0
	6,30			
	8,56			
1 % Milcheiweiß in Harnstofflösung 6 mol/l	5,24	6,12	1,20	n.b.
	5,61			
	7,50			
1 % Sojaeiweiß in pNaCl	7,36	7,26	0,69	7,0
	6,53			
	7,91			
1 % Sojaeiweiß in Harnstofflösung 6 mol/l	6,12	6,50	0,46	n.b.
	6,35			
	7,03			

n.b. = nicht bestimmbar

Gründe für die voneinander abweichenden Biuret- und Kjeldahl-Werte sind zum einen in der Unsicherheit der Biuret-Reaktion zu suchen - "Dipeptide und freie Aminosäuren reagieren mit Ausnahme des Histidins nicht" (30) - zum anderen in der vollständigen Erfassung aller Stickstoffverbindungen mittels der Kjeldahl-Methode.

3.4 Vorversuche

In Vorversuchen wurden die Einflüsse von pH-Wert, Temperatur und Extraktionsmittelmenge auf die Extraktion geprüft. Die Höhe des mittels Biuret-Reaktion erfaßten Gesamteiweißgehaltes der Extrakte diente als Kriterium zur Beurteilung der Extraktionsergebnisse.

3.4.1 Einfluß des pH

Um festzustellen, welchen Einfluß unterschiedliche pH-Werte bei der Extraktion von Proteinen aus Fleisch-Erzeugnissen haben, wurden das mit 2 % Soja- oder Milcheiweiß - bezogen auf die Fleisch- und Fettmenge - versetzte Probenmaterial sowie die Kontrollcharge mit physiologischer Kochsalzlösung als Extraktionsmittel versetzt und auf die pH-Werte 3,5, 5,5, 7,5 und 9,5 eingestellt. Danach wurde das Untersuchungsmaterial 2 Stunden bei 40 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und im Extrakt der Gesamteiweißgehalt mittels Biuret-Methode bestimmt.

3.4.1.1 Ergebnisse

Der Gesamteiweißgehalt in g/l war bei pH 9,5 am höchsten (Tab. 1). Dies dürfte jedoch nicht mit einem höheren Fremdeiweißgehalt gleichzusetzen sein, da in diesem pH-Bereich vermehrt Bindegewebeiseiweiß verleimt und in Lösung gehen kann. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, wurde deshalb in den weiteren Versuchen nahe dem Neutralpunkt bei pH 6,5 extrahiert, einem Bereich, in dem ebenfalls gute Gesamteiweißwerte erzielt wurden.

3.4.2 Einfluß der Temperatur

Als Extraktionsmittel für das Probenmaterial mit 2 % Milcheiweiß und mit 2 % Sojaeiweiß sowie für die Kontrolle dienten Veronalpuffer (pH 8,6), Harnstofflösungen mit 1, 6 und 8 mol/l und Kochsalzlösungen mit 8,75, 37,5, 68,75 und 97,5 g NaCl/l. Um den Einfluß der Temperatur auf die Effizienz der Extraktion zu ermitteln, wurde bei pH 6,5 24 Stunden lang bei 5 °C im Kühlschrank oder 2 Stunden lang bei 40 °C im Schüttelwasserbad extrahiert.

3.4.2.1 Ergebnisse

Bei einer Extraktionstemperatur von 40 °C wurden bei der Mehrzahl der geprüften Lösungsmittel höhere Gesamteiweißwerte ermittelt als bei einer Extraktion im Kühlschrank. Abweichende Ergebnisse wurden lediglich bei der Extraktion mittels Harnstofflösungen mit 6 und 8 mol/l erzielt (Tab. 2).

3.4.3 Einfluß der Extraktionsmittelmenge

In verschiedenen Literaturbeiträgen (31, 32, 56, 111) wurden unterschiedliche Lösungsmittelmengen angegeben. Um den Einfluß der Lösungsmittelmenge auf die extrahierte Gesamteiweißmenge zu prüfen, wurde aufbereitetes Material mit und ohne Fremdeiweißzusatz im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und mit NaOH 1 mol/l auf pH 6,5 eingestellt.

Nach 2 Stunden Extraktion bei 40 °C und nachfolgendem Zentrifugieren bei 10.950 g wurde der Extrakt nach Abfiltrieren über Gaze gewonnen.

3.4.3.1 Ergebnisse

Erwartungsgemäß nahm bei zunehmender Extraktionsmittelmenge der Gesamteiweißgehalt der Extrakte (g/l) ab, die Gesamtmenge (g) des extrahierten Gesamteiweißes war bei größeren Lösungsmittelmengen jedoch höher. Für die Extraktgewinnung zur Durchführung der Indirekten Häm-agglutination wurde deshalb ein konstantes Verhältnis (1:1) Einwaage zu Lösungsmittel gewählt (Tab. 3).

3.5. Hauptversuche

Die quantitative serologische Bestimmung von Fremdeiweißen (Soja-, Milcheiweiß) wurde mittels Indirekter Hämagglutination durchgeführt (2.6.3; 3.3.2) (38, 84). Dabei wurden bisher übliche Extraktionsmittel mit solchen verglichen, die Literaturhinweisen oder eigenen Überlegungen zufolge wirksamer sein müßten.

3.5.1 Extraktion von Fremdeiweiß aus den Modell-Brühwürsten

3.5.1.1 Bisher übliche Extraktionsmittel

3.5.1.1.1 Kochsalzlösungen

Es wurde mit Kochsalzlösungen folgender Konzentrationen extrahiert: 8,75, 18,75, 28,75, 48,75 und 68,75 g/l.

Ergebnisse:

Durch Erhöhung der Salzkonzentration des Lösungsmittels wird bei der Sojaeiweißextraktion die Titerabschwächung der Indirekten Hämagglutination nicht wesentlich verändert, d.h. der Einfluß der Salzkonzentration auf die Sojaeiweißextraktion ist gering (Tab. 4 - 9).

Bei der Milcheiweißextraktion konnte dagegen durch Kochsalzlösungen von 28,75 und 48,75 g/l eine bis zwei Stufen höhere Titerabschwächung erreicht werden. Die Titerabschwächung bei dem sehr hohen Salzgehalt von 68,75 g/l ist vermutlich auf einen Aussalzeffekt zurückzuführen.

3.5.1.1.2 Harnstofflösungen

Zur Extraktion von Fremdeiweißen für den serologischen Nachweis wurde Harnstoff in unterschiedlicher Molarität verwendet (88, 94). Zur Extraktion von Soja- und aufgeschlossenen Milcheiweißen aus Brühwürsten wurde die Wirkung von Harnstofflösungen mit 1, 2 und 6 mol/l geprüft.

Ergebnisse:

Die Harnstofflösung mit 6 mol/l ergab die besten Extraktionsergebnisse (Tab. 10 - 13)

3.5.1.1.3 Veronalpuffer (pH 8,6)

Der verwendete Veronalpuffer setzte sich aus 20,6 g Na-5,5-Diethylbarbiturat, 40,0 g 5,5-Diethylbarbitursäure und 0,2 g Na-Azid ad 1000 ml Aqua dest. zusammen.

Ergebnisse:

Bei Modellwürsten mit Sojaproteinzusätzen war mit Veronalpuffer nur eine geringgradig höhere Abschwächung als mit Harnstofflösung 6 mol/l zu erreichen. Bei der Extraktion von aufgeschlossenen Milcheiweißen ergab Veronalpuffer schlechtere Ausbeuten als Harnstofflösung 6 mol/l (Tab. 14-15).

3.5.1.2 Andere Extraktionsmittel

3.5.1.2.1 Extraktionsmittel mit Zusatz von 2-Mercaptoethanol

Nach WOLF (116) soll sich Mercaptoethanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) als Lösungsmittelzusatz zur Extraktion von nativen und erhitzten Sojaproteinen besonders gut eignen. Zur Prüfung dieses Vorschlags wurden physiologischer Kochsalzlösung und Harnstofflösung 6 mol/l jeweils 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter zugesetzt.

Mercaptoethanol ist eine farblose, giftige, nach Schwefelwasserstoff riechende Flüssigkeit. Sie wird zur Reduktion von Disulfidbindungen bei Proteinen verwendet. Als Zusatz zu Antigenen, die Versuchstieren zur Bildung von spezifischen Antikörpern appliziert werden, würde Mercaptoethanol im Organismus der Tiere zur Blockade der Antigen-Antikörper-Reaktionen führen (54).

Ergebnisse:

Harnstofflösung 6 mol/l mit 0,012 mol/l Mercaptoethanol führt bei Sojaeiweiß zu einer um 2 Stufen, bei Milcheiweiß zu einer um 1 Stufe höheren Titerabschwächung als Harnstoff ohne Zusatz. Eine physiologische Kochsalzlösung mit 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter ergab keine bessere Extraktionsfähigkeit als reine physiologische Kochsalzlösung (Tab. 16 und 17).

3.5.1.2.2 Extraktionsmittel mit Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS)

Natriumdodecylsulfat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) findet u.a. bei der Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode (117) und bei der Elektrophorese Verwendung. SDS ist ein Detergens und spaltet Proteine in Untereinheiten, wodurch sich jede Untereinheit zu einem stäbchenförmigen Dodecylsulfat-Polypeptid-Komplex entfalten kann. Dabei umgibt SDS die Proteine im Verhältnis 1:4 (64).

Die Extraktionswirkung wurde mit physiologischer Kochsalzlösung sowie mit Harnstofflösung 6 mol/l, die jeweils mit 0,0034 mol Dodecylsulfat pro Liter enthielten, geprüft.

Ergebnisse:

Dodecylsulfat in den Extraktionsmitteln verbesserte die Extraktionswirkung nicht (Tab. 18 und 19).

3.5.1.2.3 Extraktionsmittel mit Zusatz von Guanidiniumchlorid

Guanidin (Iminoharnstoff) ist in Alkohol und Wasser leicht löslich. In wässriger Lösung reagiert es stark alkalisch und bildet mit einem Äquivalent Säure gut kristallisierende Salze. Auf Proteine wirkt es in Form einer Verquellung (22).

Ergebnisse:

Eine Guanidiniumchloridlösung 4 mol/l war einer Harnstofflösung 6 mol/l in der Extraktionswirkung gleich (Tab. 24 und 25). pNaCl-Lösung mit 0,01 mol/l Guanidiniumchlorid oder Harnstofflösung 6 mol/l mit 0,01 mol/l Guanidiniumchlorid erhöhten die Extraktionswirkung nicht (Tab. 20 und 21).

3.5.1.2.4 Extraktionsmittel mit Zusatz von Mercaptoethanol und Guanidiniumchlorid

Zur Kombination der Effekte von Mercaptoethanol (Sprengung von Disulfidbrücken) und Guanidiniumchlorid (Eiweißverquellung) auf die Extraktion von Fremdeiweißen aus Fleisch-Erzeugnissen wurde mit 6 mol Harnstoff, 0,012 mol Mercaptoethanol und 0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter extrahiert.

Ergebnisse:

Die Kombinationslösung mit Mercaptoethanol, Guanidiniumchlorid und Harnstoff führt bei Sojaproteinzusätzen im Rahmen der Indirekten Hämagglutination zu noch höheren Titerabschwächungen als diejenigen, die von SACHER (88) mittels einer Kombination von "1 % Harnstoff und 0,7 % Mercaptoethanol in 100 ml physiologischer NaCl-Lösung" beim quantitativen Sojaisolatsnachweis erreicht wurden und erweist sich damit als optimales

Lösungsmittel zur Sojaproteinextraktion aus Brühwürsten. Bei Zusätzen von aufgeschlossenem Milcheiweiß zu Brühwürsten wirken Mercaptoethanol und Guanidiniumchlorid als Kombinationszusatz zu einer Harnstofflösung 6 mol/l als Lösungsmittel nicht stärker als Mercaptoethanol oder Guanidiniumchlorid für sich allein (Tab. 22 und 23).

3.5.2 Extraktion von Milcheiweiß aus den Modell-Kochwürsten

Die Extraktion von Milcheiweiß aus Leberwurst (9, 10) ist für den serologischen Nachweis schwierig. Wegen des hohen Lezithingehaltes der Leber bildet sich mit der Harnstofflösung 6 mol/l eine relativ stabile Emulsion; weder durch Filtrieren noch durch Zentrifugieren kann eine klare Lösung erhalten werden. Durch Ultrazentrifugieren ist zwar eine für die serologische Reaktion notwendige klare Lösung zu gewinnen, doch enthält diese kein Antigen. Durch die Hitzeeinwirkung bei der Herstellung der Fleisch-Erzeugnisse und den daraus resultierenden Eiweißdenaturierungen wird die Fremdeiweißbestimmung zusätzlich erschwert.

Für die Untersuchungen wurden die zur Extraktion von Fremdeiweißen aus Brühwurst bereits bewährten Lösungsmittel verwendet.

Von den Modellkochwürsten (3.2.2) wurden jeweils 25 g in Zentrifugiergläser eingewogen, jeweils 25 g Extraktionsmittel zugegeben und kurzzeitig homogenisiert (Ultraturrax). Der weitere Untersuchungsgang entsprach dem bei Brühwürsten (3.3.2.2).

Die Extraktionswirkung der o.a. Lösungsmittel wurde an Leberwurst mit 1-4 % Milcheiweißzusatz (75 °C Kerntemperatur) und an Leberwurst mit 1-3 % Milcheiweißzusatz (121 °C Kerntemperatur) geprüft.

3.5.2.1 Extraktion mit Harnstofflösung 6 mol/l

Die Extraktionswirkung wurde in gleicher Weise wie bei Brühwurst (3.3.2.2) geprüft.

Ergebnisse:

Für die Extraktion von Milcheiweiß aus auf 75 °C erhitzter Leberwurst war Harnstofflösung 6 mol/l ungeeignet. Klarer Extrakt war aus dem cremigen Wurstgut nur durch Ultrazentrifugation zu gewinnen. Die mit diesem Extrakt angesetzten Indirekten Hämagglutinationen ergaben keine verwertbaren Ergebnisse. Alle Verdünnungsstufen zeigten negative Reaktionen. Auch bei Leberwurst, die mit Milcheiweißzusatz hergestellt und auf 121 °C erhitzt worden war, war Harnstofflösung 6 mol/l nicht geeignet (Tab. 26).

3.5.2.2 Extraktion mit einer Lösung von 6 mol Harnstoff, 0,012 mol Mercaptoethanol und 0,052 mol Guanidiniumchlorid pro Liter

Die Extraktionswirkung wurde in gleicher Weise wie bei Brühwurst (3.3.2.2) geprüft.

Die Ergebnisse aus den Vorversuchen mit einer Lösung von 6 mol Harnstoff mit 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter ließen vermuten, daß der Zusatz von Mercaptoethanol zu Harnstofflösung die Extraktionsausbeute nicht verbessert. Nach weiteren Vorversuchen wurde eine Lösung mit 6 mol Harnstoff, 0,012 mol Mercaptoethanol und 0,052 mol Guanidiniumchlorid pro Liter verwendet.

Ergebnisse:

Wenn mit o.a. Lösung extrahiert wurde, konnte bei auf 75 °C erhitzter Leberwurst ein 1 %iger Milcheiweißzusatz eindeutig von einem 2 %igen Zusatz unterschieden werden. 2- und 3 %ige Zusätze waren kaum zu differenzieren. Ein 4 %iger Milcheiweißzusatz war wieder deut-

lich von 2- oder 3 %igen Zusätzen zu unterscheiden (Tab. 27).

Aus Leberwürsten, die auf 121 °C Kerntemperatur erhitzt worden waren, ließen sich Milcheiweißzusätze besser extrahieren. So ergab ein 2 %iger Milcheiweißzusatz eine um 2 Stufen stärkere Titerabschwächung als ein Zusatz von 1 %. 2- und 3 %ige Milcheiweißzusätze unterschieden sich deutlich durch eine Verdünnungsstufe. Aus den Tabellen 28 und 29 wird deutlich, welche Bedeutung bei einer quantitativen Auswertung der Höhe des Seruntiters zukommt. So unterschieden sich beim Titer 2¹⁶ ein 1 %iger und 2 %iger Milcheiweißzusatz durch 2 Stufen, bei Titer 2²² jedoch durch 4 Stufen.

3.5.2.3 Extraktion mit Veronalpuffer (pH 8,6)

Die Extraktionswirkung wurde in gleicher Weise wie bei Brühwurst (3.3.2.2) geprüft.

Ergebnisse:

Veronalpuffer (pH 8,6) war als Extraktionsmittel für Milcheiweiß aus Leberwürsten, die auf 75 °C oder 121 °C erhitzt worden waren, nicht geeignet (Tab. 30 und 31). Besonders auffällig war die starke Abweichung der Ergebnisse untereinander.

3.5.2.4 Extraktion mit einer Lösung von 0,052 mol Guanidiniumchlorid und von 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter

Nachdem die Extraktion von Milcheiweiß mittels Harnstoff und Zusätzen (3.5.2.2) aus erhitzter Leberwurst (75 °C) nicht befriedigte, wurde mit einer Lösung (6 mol Harnstoff + 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter) extrahiert.

Ergebnisse:

Selbst mit unterschiedlichen Serumtitern konnten 1-2 %ige Zusätze eindeutig voneinander getrennt werden (Tab. 32-37). 2- bis 3 %ige Milcheiweißzusätze waren durch eine Verdünnungsstufe ebenfalls noch sicher zu differenzieren.

Dieses Lösungsmittelgemisch erwies sich auch bei Leberwurst, die auf 121 °C erhitzt worden war, als wirkungsvolles Extraktionsmittel (Tab. 35), 1- bis 3 %ige Milcheiweißzusätze waren hier in der Indirekten Häm-agglutination durch je eine Verdünnungsstufe zu unterscheiden.

3.5.2.5 Extraktion mit Natriumdodecylsulfatlösung 0,0034 mol/l

Dodecylsulfatzusatz hatte sich bei der Extraktion von Fremdeiweiß aus Brühwürsten gegenüber anderen Lösungsmitteln als nicht vorteilhafter erwiesen. Aus diesem Grunde wurde Natriumdodecylsulfatlösung 0,0034 mol/l zur Extraktion von Milcheiweiß aus hochoerhitzten Leberwürsten nicht verwendet. Bei auf 75 °C erhitzten Leberwürsten wurde die Extraktionswirkung in gleicher Weise wie bei Brühwurst (3.3.2.2) geprüft.

Ergebnisse:

Dodecylsulfatlösung 0,0034 mol/l als Extraktionsmittel für Milcheiweißzusätze aus Leberwürsten (75 °C) ergab die bisher besten Resultate. Zusätze von 1, 2 und 3 % Milcheiweiß waren deutlich zu differenzieren (4 bzw. 2 Stufen Titerabschwächung) (Tab. 38). Mit zunehmendem Milcheiweißgehalt nimmt die Titerabschwächung ab.

3.5.2.6 Extraktion mit Guanidiniumchloridlösung 4 mol/l

Die Extraktionswirkung wurde in gleicher Weise wie bei Brühwurst (3.3.2.2) geprüft.

Ergebnisse:

Guanidiniumchloridlösung 4 mol/l (Tab. 39) läßt eine eindeutige Abstufung zwischen 1 und 2 % Milcheiweißzusatz, nicht jedoch zwischen 2 und 4 % erkennen. Guanidiniumchloridlösung 4 mol/l ist daher für den quantitativen Nachweis von Milcheiweiß in Kochwürsten weniger geeignet.

3.5.3 Agar-Gel-Diffusion

Mittels Agar-Gel-Diffusion wurde die Eignung der Extraktionsmittel für die routinemäßige, qualitative serologische Untersuchung geprüft.

3.5.3.1 Qualitativer Nachweis von Sojaprotein in Modell-Brühwürsten

Extraktionsmittel

	Antigenverdünnung					
	1	2	4	8	16	32
Kochsalzlösungen						
8,75 g/l	+	-	-	-	-	-
18,75 "	+	-	-	-	-	-
28,75 "	+	-	-	-	-	-
48,75 "	+	-	-	-	-	-
68,75 "	+	-	-	-	-	-

Harnstofflösungen

1 mol/l	+	-	-	-	-	-
2 mol/l	+	-	-	-	-	-
6 mol/l	+	-	-	-	-	-

Veronalpuffer (pH 8,6)

	-	-	-	-	-	-
--	---	---	---	---	---	---

Lösungsmittel mit Zusatz von 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter

pNaCl-Lösung	++	+	-	-	-	-
Harnstofflösung 6 mol/l	++	+	+	-	-	-

Lösungsmittel mit Zusatz von 0,0034 mol SDS pro Liter

pNaCl-Lösung	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Harnstofflösung 6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Lösungsmittel mit Zusatz von 0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter

pNaCl-Lösung	+++	++	-	-	-	-
Harnstofflösung 6 mol/l	+++	+++	+	-	-	-

Lösungsmittel mit Zusatz von 0,01 mol Guanidiniumchlorid + 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter

Harnstofflösung 6 mol/l	++	-	-	-	-	-
-------------------------	----	---	---	---	---	---

3.5.3.2 Qualitativer Nachweis von aufgeschlossenem Milchprotein in Modell-Brühwürsten

<u>Extraktionsmittel</u>	<u>Antigenverdünnung</u>					
	1	2	4	8	16	32
Kochsalzlösungen						
8,75 g/l	++	+	-	-	-	-
18,75 "	+++	+	-	-	-	-
28,75 "	++	+	-	-	-	-
48,75 "	+++	++				
68,75 "	+	+	+	-	-	-
Harnstofflösungen						
1 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Veronalpuffer (pH 8,6)	+++	++	-	-	-	-
<u>Lösungsmittel mit Zusatz von</u> <u>0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter</u>						
pNaCl-Lösung	+	-	-	-	-	-
Harnstofflösung 6 mol/l	+	-	-	-	-	-
<u>Lösungsmittel mit Zusatz von</u> <u>0,0034 mol SDS pro Liter</u>						
pNaCl-Lösung	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Harnstofflösung 6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<u>Lösungsmittel mit Zusatz von</u> <u>0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter</u>						
pNaCl-Lösung	++	+	-	-	-	-
Harnstofflösung 6 mol/l	++	+	-	-	-	-
<u>Lösungsmittel mit Zusatz von</u> <u>0,01 mol Guanidiniumchlorid</u> <u>+ 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter</u>						
Harnstofflösung 6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++

3.5.3.2 Qualitativer Nachweis von aufgeschlossenem Milchprotein in Modell-Kochwürsten

<u>Extraktionsmittel</u>	<u>Antigenverdünnung</u>					
	1	2	4	8	16	32
Lösungsmittel mit Zusatz von 0,012 mol Mercaptoethanol + 0,052 mol Guanidiniumchlorid pro Liter						
Harnstofflösung 6 mol/l	+++	+-	--	-	-	-
Veronalpuffer (pH 8,6)	+	-	-	-	-	-
SDS-Lösung 0,034 mol/l	+++	+++	+	-	-	-
Guanidiniumchloridlösung 4 mol/l	+++	++	-	-	-	-
Lösungsmittel mit Zusatz von 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter						
Guanidiniumchloridlösung 0,052 mol/l	+++	+	-	-	-	-

- = keine Reaktion
 + = schwache Reaktion
 ++ = mittlere Reaktion
 +++ = starke Reaktion

4 DISKUSSION

In der Lebensmittelüberwachung werden Zusätze von Fremdeiweißen zu Fleisch-Erzeugnissen je nach der Problemstellung chemisch, physikalisch, histologisch oder serologisch ermittelt. Für quantitative Bestimmungen von Fremdeiweiß, das bei der Gewinnung oder späteren Verarbeitung über 100 °C erhitzt sein kann, eignen sich nur serologische Methoden, insbesondere die Indirekte Hämagglutination. Versuche, den quantitativen serologischen Nachweis mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) (109) zu führen, sind erfolgversprechend (42, 74), eine befriedigende Lösung setzt allerdings noch die Klärung offener Fragen, insbesondere die Kenntnis der Herstellungsweise, der Angebotsform und der Verarbeitungsbedingungen der Fremdeiweiße voraus.

Mit der Agar-Gel-Diffusion nach OUCHTERLONY (74, 75) ist lediglich eine semiquantitative Bestimmung möglich (42, 43). Mittels chemischer Verfahren werden z.B. Milcheiweißzusätze über den Phosphoproteid-Phosphorgehalt (102, 104, 105) und Sojaweiß über dessen unvergärbare Zucker (26) oder über Rohfaser (67, 108) qualitativ bestimmt. Beim quantitativen chemischen Nachweis von Milcheiweiß in Fleisch-Erzeugnissen können z.B. Gewürze zwischen 0,7 und 5,5 % höhere Kaseinatwerte vortäuschen (23). Wegen der fehlenden reduzierenden Zuckeranteile im Sojaproteinisolat ist sein chemischer Nachweis in Fleisch-Erzeugnissen nicht möglich (114).

Der Vorrang serologischer Verfahren für den quantitativen Nachweis von Zusätzen hitzebehandelter Fremdeiweiße gegenüber anderen Methoden ergibt sich vor allem aus der Möglichkeit, spezifische Antikörper zu erzeugen (3.3.2.3.1).

Auf dem 27. Europäischen Fleischforscher-Kongreß in Wien wurde allerdings von OLSMAN (72) bestritten, daß die

von WAGENSTALLER (111) 1972 vorgestellte Indirekte Häm-agglutination für den quantitativen Nachweis von Soja-proteinzusätzen in erhitzten Fleisch-Erzeugnissen geeignet sei. Eine Überprüfung (83, 84) rechtfertigt diese Behauptung insofern, als u.a. durch den von WAGENSTALLER (111) verwendeten Veronalpuffer nicht immer genügend Fremdeiweiß aus den erhitzten Fleisch-Erzeugnissen extrahiert wird (84).

Nachdem das lyophilisierte Probenmaterial bei der Extraktionsmethode nach WAGENSTALLER (111) mit der 5fachen Lösungsmittelmenge extrahiert wird, ist es wahrscheinlich, daß der Antigengehalt des Extraktes dabei zu stark verdünnt wird. Nach eigenen Versuchen sinkt der Gesamteiweißwert mit zunehmender Extraktions-mittelmenge erheblich. Demgegenüber wurden durch einen geringeren Verdünnungsgrad des Antigens (Einwaage:Lösungs-mittel 1:1) gute Erfolge erzielt (Tab. 3).

HOFMANN und PENNY (46) schlagen zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Fremdeiweißen in erhitzten und hochoerhitzten Fleisch-Erzeugnissen mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese als Extraktionsmittel ein Gemisch von je 10 ml einer 2 %igen wässerigen SDS-Lösung und Borsäure Tris-Puffer (pH 8,3) mit 10 mg Dithiothreitol (DTT) vor. Diese "Eiweißaufschlußlösung" wurde von den Autoren (46) ausschließlich für die entsprechende Elektrophorese vorgeschlagen. Wegen der leichten Oxydierbarkeit des DTT wäre das Lösungsmittel jeweils frisch herzustellen, was im Routinebetrieb nur schwer möglich ist. Nachdem DTT die Oxydation von SH-Bindungen verhindert und die Aufspaltung von S-S-Bindungen bewirkt, war fraglich, ob auch SDS, das zur Proteinbestimmung mittels der Biuret-Methode (117) verwendet wird, allein oder in Verbindung mit anderen Extraktionsmitteln zu befriedigenden Ergebnissen führt. Die durchgeführten Versuche ergaben, daß SDS in einer Lösung 0,0034 mol/l lediglich bei Leberwurst (fettreich) zu günstigen Extraktionsergebnissen führt (Tab. 38).

Bei Brühwürsten konnte auch in Verbindung mit bewährten anderen Lösungsmitteln (Harnstoff 6 mol/l und pNaCl) (61) keine befriedigende Extraktion von Fremdeiweißzusätzen erreicht werden (Tab. 18 und 19).

HERRMANN (38) sowie DEGENKOLB und HINGERLE (13, 14) schlagen physiologische NaCl-Lösung als Extraktionsmittel vor. Die Überprüfung dieses Lösungsmittels führte zu keinen befriedigenden Ergebnissen (Tab. 4 und 7). Als Gründe kommen vorrangig die stärkere Erhitzung der gegenwärtig angebotenen Milch- und Sojaeiweiße bei ihrer Herstellung bzw. Koagulation sowie die unbefriedigende Wirkung auf die S-S- und SH-Bindungen des Untersuchungsgutes in Betracht. Außerdem soll durch physiologische NaCl-Lösung die Adsorption bereits gelöster Fremdeiweiße an Fleischteilchen des Probenmaterials nicht ausreichend verhindert werden (88).

SINELL und MENTZ (96) berichten in einem Beitrag zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels Elektro-Immunodiffusion über die Extraktionsmittel 7 M-Harnstofflösung und 7 M-Harnstofflösung, der 1 Tropfen Mercaptoethanol/10 ml zugesetzt wurde. Dabei führte der relativ geringe Zusatz zu keiner Verbesserung des Extraktionsergebnisses. Diese Feststellung ist insofern erstaunlich, als WOLF (116) die Eignung von Mercaptoethanol als Lösungsmittelzusatz zu Harnstofflösung zur Extraktion von nativem wie auch erhitztem Fremdeiweiß beschreibt. In eigenen Versuchen konnte die günstige Wirkung von Mercaptoethanol als Zusatz zu Extraktionsmitteln bestätigt werden (Tab. 16 und 17). Als Erklärung dieser Divergenz kommt vorrangig der von SINELL und MENTZ (96) verwendete zu geringe Zusatz von Mercaptoethanol (0,5 %) in Betracht. Darüber hinaus könnte diese Divergenz aber auch durch die auf Mercaptoethanol zurückgehende Spaltung der Disulfidbrücken der Proteinmoleküle in den auf 78 und 114 °C erhitzten Modellwürsten und die dadurch bedingten Ladungsveränderungen zurückzuführen sein. Für diese Vermutung spricht,

daß Mercaptoethanolzusätze auch in eigenen Versuchen dann keine Verbesserung des Extraktionsergebnisses anzeigten, wenn die Wirkung mittels Agar-Gel-Test überprüft wurde (3.5.3.1., 3.5.3.2). SINELL und MENTZ (96) überprüften die Extraktionswirkung von Mercaptoethanolzusätzen mittels Immundiffusion und konnten dabei keine Verbesserung feststellen. In eigenen Versuchen mittels der Indirekten Hämagglutination führten Mercaptoethanolzusätze zu besseren Extraktionsergebnissen (Tab. 16 und 17).

Die mangelnde Eignung von Präzipitationsverfahren im Agar-Gel zur Überprüfung der Wirkung von Mercaptoethanolzusätzen könnte auf eine Veränderung der Ionenladung der Proteinmoleküle zurückzuführen sein. So ist z.B. eine herabgesetzte Diffusionsgeschwindigkeit verbunden mit unzureichender Präzipitatbildung im Agar-Gel-Medium möglich (50).

STUTZ-BAASCH (101) extrahierte aufgeschlossenes Milcheiweiß aus Modellwürsten, die auf 70 bzw. 115 °C erhitzt worden waren, mittels Veronal- und Phosphatpuffer sowie pNaCl-Lösung und kochendem Veronalpuffer und erreichte mit Veronalpuffer und mit kochendem Veronalpuffer die eindeutig besten Extraktionsergebnisse.

GERIGK und KRÜGER (24) stellten demgegenüber in ihren "Untersuchungen zur Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleischwaren" keine Überlegenheit des Veronalpuffers gegenüber pNaCl-Lösung bei der Extraktion von Zusätzen von aufgeschlossenem Milcheiweiß aus Brühwürsten, die auf 75, 105 oder 121 °C Kerntemperatur erhitzt worden waren, fest. Eigenen Untersuchungen zufolge kann die von STUTZ-BAASCH (101) postulierte Überlegenheit des Veronalpuffers gegenüber physiologischer NaCl-Lösung als Extraktionsmittel bei aufgeschlossenem Milcheiweiß auch nicht bestätigt werden (Tab. 15). Bei der Extraktion von Sojaproteinzusätzen aus Brühwürsten erwies sich Veronalpuffer gegenüber physiologischer NaCl-Lösung jedoch als vorteilhafter (Tab. 14).

MENZEL und GLATZ (66) führten im Rahmen ihrer Beschreibung eines qualitativen Nachweises von nativem und hitzedenaturiertem Sojaprotein mittels Radioimmunoassay (RIA) u.a. Guanidiniumchloridlösung 6 mol/l als Lösungsmittel an. In eigenen Untersuchungen wurde die Wirkung von Guanidiniumchloridlösung als Extraktionsmittel zunächst in verminderter Konzentration (4 mol/l) geprüft (Tab. 24, 25, 39), um negative Auswirkungen auf das Antigen und insbesondere auf die Antikörper auszuschließen. Darüber hinaus wurden pNaCl-Lösung mit 0,01 mol/l Guanidiniumchlorid und Harnstofflösung 6 mol/l in diese Untersuchung einbezogen (Tab. 20, 21). Die Ergebnisse dieser Versuche befriedigten jedoch nicht. Nachdem z.B. Harnstofflösung 6 mol/l die Extraktionswirkung der o.a. Lösungsmittel übertraf und sich die Verwendung von lediglich Guanidiniumchloridlösung 4 mol/l bereits nachteilig auf die Verwendbarkeit des Untersuchungsextraktes auswirkte, erübrigte sich die Prüfung einer höher molaren Guanidiniumchloridlösung. Aussichtsreicher erschien die kombinierte Verwendung von Mercaptoethanol und Guanidiniumchlorid als Zusatz zu Lösungsmitteln. Eine Lösung von 6 mol Harnstoff + 0,012 mol Mercaptoethanol + 0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter führte bei Sojaproteinen zu einer weiteren Verbesserung des Extraktionsergebnisses (Tab. 22). Demgegenüber konnte bei Milcheiweiß durch diese Kombination keine weitere Verbesserung erzielt werden (Tab. 23).

Harnstofflösung 6 mol/l mit 0,012 mol/l Mercaptoethanol oder 0,01 mol/l Guanidiniumchlorid führte zu einer weniger starken Titerabschwächung in der Indirekten Hämagglutination als eine Kombination dieser Zusätze. Es ist daher zu vermuten, daß die hitzeoagulierten Antigene durch die additive Wirkung des eiweißverquellenden Guanidiniumchlorids und des disulfidbrückensprengenden Mercaptoethanols leichter extrahierbar werden.

BREHMER und GERDES (9, 10) berichteten über den quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels

Elektroimmunodiffusion und der Methode nach THALACKER bei auf 80 und 120 °C erhitzten Brühwürsten, bei auf 110 °C erhitzter Leberwurst, bei auf 110 °C erhitztem Schmalzfleisch und bei auf 120 °C erhitztem Frühstücksfleisch. Als Extraktionsmittel diente 7 M-Harnstofflösung. Bei den Ergebnissen wird angemerkt, daß die Leberwürste gegenüber den anderen Proben "ein etwas anderes Verhalten zeigen", indem sie "im EID-Verfahren durchschnittlich um 6 % höhere Ergebnisse liefern". Die Ursache dieser Abweichung wird in der unterschiedlichen Extrahierbarkeit des Kaseinats aus den o.a. Erzeugnissen vermutet.

In eigenen Untersuchungen konnte mittels Harnstofflösung 6 mol/l und Veronalpuffer aus lediglich auf 75 °C erhitzten Leberwürsten nicht genügend aufgeschlossenes Milcheiweiß extrahiert werden, die Überprüfung der Ergebnisse in der Indirekten Hämagglutination ermöglichte keinen quantitativen Nachweis (3.5.2.1, Tab. 30). Befriedigende Extraktionsergebnisse konnten auch bei Leberwurst, die auf 75 °C und auf 121 °C erhitzt worden war, erst durch eine Harnstofflösung 6 mol/l mit 0,012 mol Mercaptoethanol und 0,052 mol Guanidiniumchlorid pro Liter erreicht werden (Tab. 27, 28, 29).

FISCHER und BELITZ (20) extrahierten Sojaeiweiß aus Fleisch-Erzeugnissen mittels Aceton, versetzten den Rückstand mit Tris-Glycerin-Puffer und führten den Nachweis des zugesetzten Sojaproteins in der Elektrophorese. Für den Nachweis von Fremdeiweißen mittels Indirekter Hämagglutination ist Aceton als Extraktionsmittel ungeeignet, weil es die Sensibilisierung der Erythrozyten stört. Der Kontakt der Erythrozyten mit dem Antigen, das im Rahmen der Sensibilisierung an die Oberfläche der Erythrozyten gebunden wird, soll durch spezifische Rezeptoren erfolgen. BOYDEN und GRABAR (7) betrachteten die Rezeptoren als Lipide, weil eine Tuberkulin-Polysaccharidfraktion, die mit Erythrozytenstroma oder Alkohol-Ätherextrakten aus roten Blutkörperchen vermischt worden war, ihre sensibilisierende Wirkung

verloren hatte (27). Es ist zu vermuten, daß Aceton als Extraktionsmittel in der Indirekten Hämagglutination zu gleichartigen Veränderungen der Erythrozyten führt.

DE WREEDE und STEGEMANN (117) beschrieben die Proteinbestimmung in Extrakten aus nativem und gekochtem Fleisch mittels Biuret-Reaktion, wobei die Extraktion durch SDS- oder Mercaptoethanolzusätze modifiziert worden war. In eigenen Vorversuchen versagte die Gesamteiweißbestimmung mittels Biuret-Reaktion bei Extrakten, die mit ähnlichen Extraktionsverfahren aus Brühwürsten (70 °C) mit Zusätzen von Milch- oder Sojaeiweiß gewonnen worden waren. Die Biuret-Reaktion wurde nach dem Mercaptoethanol-Zusatz durch Grünverfärbung gestört.

Durch den Verzicht auf einen Mercaptoethanol-Zusatz im Extraktionsmittel konnte diese Störung zwar vermieden werden, die Ergebnisse wiesen jedoch zum Teil erhebliche Abweichungen voneinander auf (Tab. 1, 2, 3). Auch WAGENSTALLER (111) kam bei erhitzten Fleisch-Erzeugnissen mittels Biuret-Reaktion zu keiner realistischen Aussage über den Gesamteiweißgehalt.

Ein immer wieder vorgebrachter Einwand gegen die Indirekte Hämagglutination ist der damit verbundene große Arbeitsaufwand (14). Dieser Einwand könnte ergänzt werden durch die Forderung, daß zur sachgerechten Durchführung dieser Methode nur einschlägig erfahrenes Personal und darüber hinaus relativ große Mengen spezifischen Antiserums benötigt werden (84).

Diesen Einwänden ist entgegenzuhalten, daß die Indirekte Hämagglutination noch immer die einzige zuverlässige Methode für den quantitativen Nachweis von Fremdeiweißen in hochoerhitzten Fleisch-Erzeugnissen ist. Eine mögliche künftige Alternative - der quantitative Nachweis mittels "Elisa" - erfordert unter der Voraussetzung, daß die Weiterentwicklung einen späteren Einsatz als Routine-test ermöglicht, mindestens den gleichen Arbeitsaufwand und Sachverstand.

Ziel dieser Arbeit war es, wirkungsvollere Extraktionsmittel für Fremdeiweiße zu finden. Verschiedene serologische Verfahren dienten als Test-Systeme. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Zur Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes in Extrakten aus erhitzten Fleisch-Erzeugnissen eignet sich die Biuret-Methode lediglich als Screeningtest.

Die Indirekte Hämagglutination ist gegenwärtig das einzige zuverlässige Verfahren zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweiß-Zusätzen in hocherhitzten Fleisch-Erzeugnissen.

Für die nach neueren Verfahren hergestellten Fremdeiweiße sind gegenüber früher andere oder modifizierte Extraktionsmittel erforderlich.

Zur Extraktion von Sojaproteinisolat-Zusätzen aus Brühwürsten erwies sich eine Lösung von 6 mol Harnstoff + 0,012 mol Mercaptoethanol + 0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter gegenüber anderen geprüften Lösungsmitteln als vorteilhaft.

Zur Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß aus Brühwürsten ist eine Lösung von 6 mol Harnstoff + 0,01 mol Guanidiniumchlorid + 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter nicht wirkungsvoller als diese Kombination ohne den Zusatz von Guanidiniumchlorid.

Bei Leberwurst sind je nach Erhitzungsgrad (75, 121 °C) unterschiedliche Extraktionsmittel zweckmäßig.

Zur Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß aus Leberwurst, die auf 75 °C erhitzt wurde, eignet sich eine Natriumdodecylsulfatlösung 0,0034 mol/l am besten, zur Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß aus Leberwurst, die auf 121 °C erhitzt wurde, eine Lösung von 6 mol Harnstoff + 0,012 mol Mercaptoethanol + 0,052 mol Guanidiniumchlorid pro Liter.

Extraction of soy protein and hydrolized milk protein from heated meat products

The aim of this work was to find more efficient extraction agents for non-meat proteins. Different serological techniques served as testing systems. The following results were obtained:

For the determination of the total protein content of extracts from processed meat products, the biuret method is suitable only as a screening test.

At present indirect hemagglutination is the only reliable technique to obtain quantitative proof of non-meat protein admixtures in highly processed meat products. The techniques to produce non-meat proteins have changed; therefore different or modified extraction agents are necessary.

For the extraction of isolated soy-protein admixtures from "Brühwurst" (sausages type Bologna) a solution of 6 mol urea + 0.012 mol mercaptoethanol + 0.01 mol guanidiniumchloride/l turned out to be advantageous compared to other solvents tested.

A solution of 6 mol urea + 0.01 mol guanidiniumchloride + 0.012 mol mercaptoethanol/l is no more effective for the extraction of precipitated milk-protein from "Brühwürste" than the combination without guanidiniumchloride.

Depending on the temperature of preparation (75, 121 °C) different extraction agents are efficient for "Leberwürste" (sausages from cooked meat).

The most efficient agents for the extraction of precipitated milk-protein from "Leberwürste" are:

A sodiumdodecylsulfate solution 0.0034 mol/l (for "Leberwürste" prepared at 75 °C);

a solution of 6 mol urea + 0.012 mol mercaptoethanol + 0.052 mol guanidiniumchloride/l (for "Leberwürste" prepared at 121 °C).

Tabelle 1: Gesamteiweißgehalte der mit physiologischer NaCl-Lösung gewonnenen Extrakte aus Modellwürsten (Biuret-Methode) bei verschiedenen pH-Werten (g/l)

Zusätze: 2 g Fremdeiweiß/100 g Fleisch- und Fettmenge

pH	Milcheiweiß			Sojaeiweiß			Kontrolle		
	x_i	$\bar{x}$	$\pm s$	x_i	$\bar{x}$	$\pm s$	x_i	$\bar{x}$	$\pm s$
3,5	4,5	5,7	1,6	7,2	7,9	0,87	7,4	8,5	1,4
	5,1			7,5			8,5		
	7,5			8,9			10,1		
5,5	9,2	9,7	0,69	8,3	8,6	0,28	8,3	8,3	0,3
	10,6			8,7			8,0		
	9,7			8,8			8,6		
6,5	10,8	11,0	1,0	10,1	10,7	0,69	8,7	8,5	0,2
	10,1			10,5			8,2		
	12,1			11,5			8,6		
7,5	13,3	15,3	1,8	6,0	6,7	0,64	8,0	8,6	0,6
	15,7			7,4			8,9		
	16,8			6,9			8,9		
9,5	16,6	17,5	1,1	9,4	10,2	1,1	9,1	10,6	1,2
	17,0			9,7			11,5		
	18,6			11,6			11,0		

Tabelle 2: Gesamteiweißgehalte der mit Harnstofflösungen, NaCl-Lösungen oder Veronalpuffer gewonnenen Extrakte aus Modellwürsten (Biuret-Methode) bei 40 bzw. 5°C

Zusätze: 2 g Fremdeiweiß/100 g Fleisch- und Fettmenge

Extraktions- mittel	Milcheiweiß			Sojaeiweiß			Kontrolle		
	x_i	$\bar{x}$	$\pm s$	x_i	$\bar{x}$	$\pm s$	x_i	$\bar{x}$	$\pm s$
a) 2-stündige Extraktion bei 40 °C									
Harnstofflö- sung 1 mol/l	7,6			9,6			7,0		
	9,2	9,0	1,3	9,2	9,8	0,72	8,8	8,2	0,92
	10,3			10,6			8,7		
Harnstofflö- sung 6 mol/l	7,0			6,2			10,6		
	7,5	6,8	0,78	5,9	6,4	0,78	9,2	10,7	1,5
	5,9			7,4			12,3		
Harnstofflö- sung 8 mol/l	6,9			7,5			7,2		
	6,5	7,1	0,69	8,7	7,8	0,83	6,0	7,0	0,96
	7,9			7,1			8,0		
NaCl-Lösung 8,75 g/l	10,1			10,1			8,7		
	10,8	11,0	0,97	10,5	10,7	0,74	8,2	8,5	0,23
	12,1			11,5			8,5		
NaCl-Lösung 37,5 g/l	8,0			8,0			5,6		
	7,6	9,1	2,9	9,3	8,3	0,93	8,5	8,0	2,3
	11,7			7,5			10,3		
NaCl-Lösung 68,75 g/l	7,9			9,7			6,1		
	7,6	8,0	0,6	10,3	10,8	1,4	8,8	8,0	1,6
	8,8			12,5			9,2		
NaCl-Lösung 97,5 g/l	8,7			6,6			9,2		
	7,5	8,6	0,74	8,1	7,9	2,3	11,3	9,9	1,1
	8,8			11,2			9,6		
Veronalpuffer (pH 8,6)	6,6			7,0			9,8		
	8,1	6,8	1,1	8,9	7,9	0,92	9,1	9,9	0,87
	6,0			8,1			10,9		
b) 24-stündige Extraktion bei 5 °C									
Harnstofflö- sung 1 mol/l	7,8			6,4			5,7		
	7,5	8,1	0,92	7,2	7,0	0,41	4,5	5,3	0,73
	9,2			7,4			5,7		
Harnstofflö- sung 6 mol/l	8,5			10,6			6,6		
	7,6	8,0	0,41	11,1	11,5	1,4	8,1	8,2	1,6
	8,0			13,2			9,9		
Harnstofflö- sung 8 mol/l	7,0			12,0			9,1		
	6,2	5,9	1,3	11,4	11,8	0,46	7,5	8,2	1,4
	7,4			12,4			9,9		
NaCl-Lösung 8,75 g/l	5,9			7,4			3,5		
	6,3	6,2	0,51	8,3	8,0	0,37	4,2	4,5	1,1
	6,6			8,5			5,8		
NaCl-Lösung 37,5 g/l	6,8			6,9			4,7		
	7,6	6,9	0,64	7,7	6,9	0,51	5,3	5,2	0,41
	6,3			6,2			5,5		
NaCl-Lösung 68,75 g/l	6,7			5,1			5,1		
	6,8	7,1	0,69	6,3	5,8	0,64	6,2	5,8	0,64
	7,9			6,0			6,2		
NaCl-Lösung 97,5 g/l	8,9			5,2			5,5		
	7,0	8,5	1,4	7,4	7,1	1,8	3,9	4,8	1,2
	9,8			8,8			6,2		
Veronalpuffer (pH 8,6)	6,0			6,5			6,3		
	7,0	6,4	0,51	7,7	6,8	0,74	7,1	5,7	1,7
	6,4			6,4			3,8		

Tabelle 3: Gesamteiweißgehalte der mit physiologischer NaCl-Lösung gewonnenen Extrakte aus Modellwürsten (Biuret-Methode) bei variabler Lösungsmittelmenge

a) Gehalte in g/l Extrakt

Zusätze: 2 g Fremdeiweiß/100 g Fleisch- und Fettmenge

Probenmaterial zu Lösungs- mittel (Gew.- Anteile)	Milcheiweiß			Sojaeiweiß			Kontrolle		
	x_i	$\bar{x}$	$\pm s$	x_i	$\bar{x}$	$\pm s$	x_i	$\bar{x}$	$\pm s$
1:1	12,0			9,0			5,1		
	11,0	12,8	1,9	9,2	9,5	0,97	5,5	5,4	0,1
	14,3			10,3			5,7		
1:2	9,7			5,1			4,3		
	7,3	9,1	1,6	5,5	6,0	1,1	4,0	4,3	0,3
	10,3			7,2			4,5		
1:3	4,3			4,0			2,4		
	5,6	4,8	0,78	4,6	4,9	1,0	3,1	2,8	0,3
	4,4			6,0			3,1		
1:4	4,0			2,6			2,2		
	4,4	4,0	0,4	3,5	3,6	1,1	2,6	2,4	0,2
	3,6			4,8			2,3		

b) Gehalte im gesamten Extrakt in g

Zusätze, bezogen auf Fleisch- und Fettmenge

Probenmaterial	2 % Milcheiweiß	2 % Sojaeiweiß	Kontrolle
1:1	12,8	9,5	5,4
1:2	18,2	12,0	8,6
1:3	14,4	14,7	8,4
1:4	16,0	14,4	9,6

Tabelle 4: Sojaeiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Sojaisolat; Titer des Antiserums 65456

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontroll- wurst ⁺)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Soja- isolat-Lösung	+++	+++	+++	+++												
Modell-Brüh- wurst:																
Extraktions- mittel: NaCl-Lösung g/l																
8,75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
18,75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+) Extraktionsmittel: pNaCl-Lösung

Tabelle 5: Sojaseiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Sojaisolat; Titer des Antiserums 65456

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontroll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 % ige Soja- isolat-Lsg.	+++	+++	+++	+++												
Modell-Brüh- wurst:	+++	+++	+++	+++												
Extraktions- mittel:																
NaCl-Lösung g/l																
28,75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+					
48,75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+					

+) Extraktionsmittel: pNaCl-Lösung

Tabelle 6: Sojaeiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Sojaisolat; Titer des Antiserums 65456

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontröll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 % ige Soja- isolat-Lsg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Modell-Brüh- wurst:																
Extraktions- mittel: NaCl-Lösung g/l																
68,75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						

+) Extraktionsmittel: pNaCl-Lösung

Tabelle 7: Milcheiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten mit 2 % Milcheiweiß; Titer des Antiserums 130912

[illegible]

+) Extraktionsmittel: pNaCl-Lösung

Tabelle 8: Milcheiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Milcheiweiß; Titer des Antiserums 130912

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontröll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 % ige Milch- eiweiß-Lsg.	+++	+++	+++	+++													
Modell-Brüh- wurst:																	
Extraktions- mittel: NaCl-Lösung g/l																	
28,75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
48,75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		

+) Extraktionsmittel:pNaCl-Lösung

Tabelle 9: Milcheiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Milcheiweiß; Titer des Antiserums 130912

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	130912
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontr ^o ll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 % ige Milch- eiweiß-Lsg.	+++	+++	+++	+++													
Modell-Brüh- wurst:																	
Extraktions- mittel: NaCl-Lösung g/l																	
68,75	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+) Extraktionsmittel: pNaCl-Lösung

Tabelle 10: Sojaeiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Sojaisolat; Titer des Antiserums 65456

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontröll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 % ige Soja- isolat-Lsg.	+++	+++	+++	+++												
Modell-Brüh- wurst:																
Extraktions- mittel:																
Harnstofflösung																
1 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
2 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+			

+) Extraktionsmittel: Harnstofflösung 6 mol/l

Tabelle 11: Sojaeiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten mit 2 % Sojaisolat; Titer des Antiserums 65456

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontroll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 % ige Soja- isolat-Lsg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Modell-Brüh- wurst:																
Extraktions- mittel:																
Harnstofflösung																
6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+) Extraktionsmittel: Harnstofflösung 6 mol/l

Tabelle 12: Milcheiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Milcheiweiß; Titer des Antiserums 130912

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrol- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lsg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Modell-Brüh- wurst:	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Extraktions- mittel:																	
Harnstofflösung																	
1 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+) Extraktionsmittel: Harnstofflösung 6 mol/l

Tabelle 13: Milcheiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten mit 2 % Milcheiweiß; Titer des Antiserums 130912

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	130912
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontroll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lsg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Modell-Brüh- wurst:	+++	+++	+++	+++													
Extraktions- mittel:																	
Harnstofflösung																	
6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							

+) Extraktionsmittel: Harnstofflösung 6 mol/l

Tabelle 14: Sojaeiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten mit 2 % Sojaisolat; Titer des Antiserums 65456; Extraktionsmittel: Veronalpuffer (pH 8,6)

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontroll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Soja- isolat-Lsg.	+++	+++	+++	+++												
Modell-Brüh- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							

Tabelle 15: Milcheiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten

mit 2 % Milcheiweiß; Titer des Antiserums 130912; Extraktionsmittel: Veronalpuffer (pH 8,6)

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontroll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lsg.	+++	+++	+++	+++													
Modell-Brüh- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tabelle 16: Sojaweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Sojaisolat; Titer des Antiserums 65456

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrol- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
2 %ige Soja- isolat-Lsg.	+++	+++	+++	+++												
Modell-Brüh- wurst:				+++												
Extraktions- mittel mit 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter																
pNaCl-Lösung	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Harnstofflö- sung 6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++									
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+) Extraktionsmittel: pNaCl-Lösung mit 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter

Tabelle 17: Milcheiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Milcheiweiß; Titer des Antiserums 261824

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontroll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lsg.	+++	+++	+++	+++	+++													
Modell-Brüh- wurst:	+++	+++	+++	+++	+++													
Extraktions- mittel mit 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter																		
pNaCl-Lösung	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Harnstofflö- sung 6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+) Extraktionsmittel pNaCl-Lösung mit 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter

Tabelle 19: Milcheiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Milcheiweiß; Titer des Antiserums 261824

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912	261824
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrol- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lsg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Modell-Brüh- wurst:																		
Extraktions- mittel mit 0,0034 mol Dodecylsulfat pro Liter																		
pNaCl-Lösung	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Harnstofflö- sung 6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+) Extraktionsmittel pNaCl-Lösung mit 0,0034 mol Dodecylsulfat pro Liter

Tabelle 20: Sojaeiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten
mit 2 % Sojaisolat; Titer des Antiserums 130912

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrol- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Soja- isolat-Lsg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Modell-Brüh- wurst:																	
Extraktions- mittel mit 0,01 mol Guanidinium- chlorid pro Liter	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pNaCl-Lösung	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Harnstofflö- sung 6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+) Extraktionsmittel pNaCl-Lösung mit 0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter

Tabelle 21: Milcheiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten mit 2 % Milcheiweiß; Titer des Antiserums 130912

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	65536	130912
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontroll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Soja- isolat-Lsg.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Modell-Brüh- wurst:																	
Extraktions- mittel mit 0,01 mol Guanidinium- chlorid pro Liter																	
pNaCl-Lösung	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Harnstofflö- sung 6 mol/l	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+) Extraktionsmittel pNaCl-Lösung mit 0,01 mol Guanidiniumchlorid pro Liter

Tabelle 24: Sojaiweiß-Titer in auf 70 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Brühwürsten mit 2 % Sojaisolat; Titer des Antiserums 130912; Extraktionsmittel: Guanidiniumchloridlösung 4 mol/l

Verdünnung	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456	130912
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontroll- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Soja- isolat-Lsg.	+++	+++	+++														
Modell-Brüh- wurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tabelle 26: Milcheiweiß-Titer in auf 121 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Leberwürsten;
Titer des Antiserums 2²²; Extraktionsmittel: Harnstofflösung 6 mol/l

Verdünnung	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵	2 ¹⁶	2 ¹⁷	2 ¹⁸	2 ¹⁹	2 ²⁰	2 ²¹	2 ²²
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrollwurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lösung	+++															
Modell-Leber- wurst:																
mit 1 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
mit 2 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					

Tabelle 28: Milcheiweiß-Titer in auf 121 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Leberwürsten;
Titer des Antiserums 2¹⁶; Extraktionsmittel: Lösung von 6 mol Harnstoff,
0,012 mol Mercaptoethanol und 0,052 mol Guanidiniumchlorid pro Liter

Verdünnung	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵	2 ¹⁶
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrollwurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lösung	+++	+++	+++													
Modell-Leber- wurst:																
mit 1 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
mit 2 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++								
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++								
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++								
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
mit 3 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++									
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++									
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++									
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++									
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++								
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++								

Tabelle 29: Milcheiweiß-Titer in auf 121 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Leberwürsten;
Titer des Antiserums 2²²; Extraktionsmittel: Lösung von 6 mol Harnstoff,
0,012 mol Mercaptoethanol und 0,052 mol Guanidiniumchlorid pro Liter

Verdünnung	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵	2 ¹⁶	2 ¹⁷	2 ¹⁸	2 ¹⁹	2 ²⁰	2 ²¹	2 ²²
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrollwurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lösung	+++															
Modell-Leber- wurst:																
mit 1 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
mit 2 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			

Tabelle 30: Milcheiweiß-Titer in auf 75 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Leberwürsten;
Titer des Antiserums 2¹⁵; Extraktionsmittel: Veronalpuffer (pH 8,6)

Verdünnung	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrollwurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lösung	+++	+++	+++												
Modell-Leber- wurst:															
mit 1 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++		
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++				
mit 2 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				

Tabelle 31: Milcheiweiß-Titer in auf 121 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Leberwürsten;
Titer des Antiserums 22; Extraktionsmittel: Veronalpuffer (pH 8,6)

Verdünnung	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵	2 ¹⁶	2 ¹⁷	2 ¹⁸	2 ¹⁹	2 ²⁰	2 ²¹	2 ²²
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrollwurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lösung	+++															
Modell-Leber wurst:																
mit 1 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++								
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++									
mit 2 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					

Tabelle 32: Milcheiweiß-Titer in auf 75 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Leberwürsten;
Titer des Antiserums 2¹⁶; Extraktionsmittel: Lösung von 0,052 mol Guanidinium-
chlorid und 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter

Verdünnung	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵	2 ¹⁶
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrollwurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lösung	+++													
Modell-Leber- wurst:														
mit 1 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+		
mit 2 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
mit 3 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			

Tabelle 35: Milcheiweiß-Titer in auf 121 °C Kerntemperatur erhitzten Modell-Leberwürsten;
Titer des Antiserums 2¹⁹; Extraktionsmittel: Lösung von 0,052 mol Guanidinium-
chlorid und 0,012 mol Mercaptoethanol pro Liter

Verdünnung	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	2 ¹²	2 ¹³	2 ¹⁴	2 ¹⁵	2 ¹⁶	2 ¹⁷	2 ¹⁸	2 ¹⁹
Titer	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrollwurst	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 %ige Milch- eiweiß-Lösung	+++	+++	+++	+++												
Modell-Leber- wurst:																
mit 1 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
mit 2 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
mit 3 % Milch- eiweiß	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++							
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+						

1. Baal, J.P.W. van, und N.N. Leget:
Nachweis von Kasein und Na-Kaseinat in Fleischprodukten.
Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 127 (1965), 779
2. Bailey, J.: Zitiert von Boksch, W.:
Isoliertes Sojaeiweiß, ein möglicher Hilfsstoff für lang
zu lagernde Brühwurstkonserven.
Fleischwirtschaft 45 (1965), 779
3. Belitz, H.-D., und J. Schormüller:
Aminosäuren, Peptide, Proteine und andere Stickstoff-
verbindungen.
In: Schormüller, J. (Hrsg.): Handbuch der Lebensmittel-
chemie. Bd. 1.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965, S. 167
4. Beyer, H.:
Handbuch der organischen Chemie.
18. Aufl.
Verlag Hirzel, Stuttgart 1976
5. Blix, G., K. Felix, W. Grassmann, J. Trupke, D. Ackermann
und F. Schneider:
Eiweißstoffe und ihre Abbaustufen.
In: Flaschenträger, B. und E. Lehnartz: Physiologische
Chemie. Bd. 1.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1951, S. 484
6. Boyden, S.V.:
The absorption of proteins on erythrocytes treated with
tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein
in sera.
J. Exper. Med. 93 (1951), 107

7. Boyden, S.V., et P. Grabar:
Rôle des lipides dans la sensibilisation des erythrocytes
par les constituants de la tuberculine.
Ann. Inst. Pasteur 87 (1954), 257
8. Braun, G.:
Bemerkungen zur Milcheiweißbestimmung in Fleischerzeug-
nissen.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 129 (1965/66), 160
9. Brehmer, H., und H. Gerdes:
Vergleichende quantitative Milcheiweißuntersuchungen
mit Hilfe der Elektroimmunodiffusion und des Thalacker-
Verfahrens aus Modellwurstherzeugnissen nach Art der
Brühwurst.
Fleischwirtschaft 58 (1978), 1516
10. Brehmer, H., und H. Gerdes:
Quantitative Bestimmungen von aufgeschlossenem Milch-
eiweiß mit Hilfe eines Elektroimmunodiffusions-Verfahrens
und der Thalacker-Methode in Modellwurstherzeugnissen
aus dem Handel.
Fleischwirtschaft 60 (1980), 1374
11. Darcy, D.A.:
A quantitative application of the agar diffusion plate:
The estimation of specific proteins in serum.
Immunol. 3 (1960), 325
12. Daum, V.:
Zum quantitativen serologischen Nachweis von Blutplasma
in Roh- und Brühwürsten.
Diss. med. vet., München 1984
13. Degenkolb, E., und M. Hingerle:
Untersuchungen über den serologischen Nachweis von
Fremdeiweißzusätzen.
Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967), 241

14. Degenkolb, E., und M. Hingerle:
Eine serologische Schnellmethode zum quantitativen
Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturier-
ten Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 73
15. Dittmer, A.:
Plasmaeiweiß und Elektrophorese.
3. Aufl.
Verlag Fischer, Jena 1965, S. 5, 22
16. Enoch, Ch.:
Zur biologischen Differenzierung von hocherhitzten
Fleischwaren. Vergleichende Untersuchungen mittels
Agar-Gel-Diffusion, Immunelektrophorese und indirek-
ter Hämagglutination.
Diss. med. vet., München 1967
17. Fasold, H.:
Die Struktur der Proteine.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1972
18. Feder, E.:
Zur Prüfung von Fleischaschen bei Zusatz von Eiweiß-
präparaten zu Fleischwaren.
Z. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel 17 (1909), 191
19. Feist, H.:
Spezifischer Nachweis von aufgeschlossenem Milch-
eiweiß in Fleischerzeugnissen mittels Polyacrylamid-
gel-Elektrophorese.
Diss. med. vet., München 1975
20. Fischer, K.-H., und H.-D. Belitz:
Elektrophoretischer Nachweis von Soja-Eiweiß in
Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsch. 145 (1971), 271

21. Freimuth, U., und W. Krause:
Zum gelelektrophoretischen Nachweis von Fremdprotein
in Milch und Fleischerzeugnissen.
Mitt. GDCh Fachgr. Lebensmittelchemie u. gerichtl.
Chemie 22 (1968), 217
22. Frimmer, M.:
Pharmakologie und Toxikologie. 2. Aufl.
Verlag Schattauer, Stuttgart-New York 1977
23. Gerhardt, U., und R. Kauper:
Vergleichende Untersuchungen über den scheinbaren
Milchweißgehalt in Gewürzen nach der THALACKER-
Methode.
Fleischwirtschaft 59 (1979), 97
24. Gerigk, K., und H. Krüger:
Untersuchungen zur Extraktion von Fremdeiweiß aus
Fleischwaren.
Zbl. Vet. Med. B 19 (1972), 226
25. Grabar, P., et C.A. Williams:
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés
électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange
de protéines.
Application au sérum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta 10 (1953), 193
26. Günther, H.:
Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 97
27. Hanson, L.A.:
Immunological technique for the detection of milk
proteins in food products.
Nord. Vet. Med. 16 (1964), 201

28. Haurowitz, F.:
Eiweißdenaturierung.
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der
physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.
Bd. IV/1
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960,
S. 116
29. Hayward, R.J., and R. Augustin:
Quantitative geldiffusion methods for assay of
antigens and antibodies.
Int. Arch. Allergy 11 (1957), 192
30. Heimann, W.:
Grundzüge der Lebensmittelchemie.
Verlag Steinkopff, Dresden 1969
31. Heinert, H.H., und A. Klinger:
Tierartspezifische Eiweißdifferenzierung.
Polyacrylamidgel-Elektrophorese zum Nachweis der
Tierart.
Fleischwirtschaft 58 (1978), 1490
32. Heinert, H.H., und A. Klinger:
Protein- und Enzymmuster bei Reh (Capreolus Capreolus)
und Hirsch (Cervus elaphus).
Fleischwirtschaft 60 (1980), 1682
33. Heinert, H.H., und H.-J. Baumann:
Nachweis von Sojaprotein in Brühwurst.
PoropAGE unter Zusatz von SDS und Harnstoff.
Fleischwirtschaft 64 (1984), 89
34. Helferad, B.:
Bestimmung von zugesetztem Sojaprotein und Na-
Caseinat in sterilisierten Fleischerzeugnissen
mittels der Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Tidsskrift for Hermetikindustri 59 (1973), 224

35. Hellmannsberger, L.:
Routinenachweis von Fremdeiweißen in erhitzten
Fleisch-Erzeugnissen mittels Polyacrylamid-Gel-
(Disk-)Elektrophorese.
Diss. med. vet., München 1981
36. Hendrey, W.B.:
Determination of soybean flour in sausage by non-
fermentable sugars.
Industr. Eng. Chem., Analyt. Ed. 11 (1939), 611
37. Herrmann, Ch.:
Über den Nachweis von hitzedenaturiertem Hühner-
eiklar in Fleischwaren mit Hilfe der indirekten
Hämagglutination.
Diss. med. vet., München 1963
38. Herrmann, Ch.:
Über die zugleich quantitative Differenzierung von
erhitztem Eiweiß mittels der indirekten Hämaggluti-
nation.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 78 (1965), 370
39. Herrmann, Ch., D. Holpert und G. Pfeiffer:
Zur serologischen Erfassung von aufgeschlossenem
Milcheiweiß in hochehitzten Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 17 (1966), 12
40. Herrmann, Ch., und L. Kotter:
Serologische Verfahren bei der Überwachung von
Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 265
41. Herrmann, Ch.:
Serologische Untersuchungsmethoden in der tierärzt-
lichen Lebensmittelüberwachung.
Wehrmed. 7 (1969), 16

42. Herrmann, Ch., Ch. Merkle und L. Kotter:
Zur Problematik serologischer Nachweisreaktionen
für Fremdeiweiß in erhitzten Fleischerzeugnissen.
1. Mitt.: Präzipitationsreaktionen.
2. Mitt.: Agglutinationsreaktionen.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 97, 249
43. Herrmann, Ch., J. den Hartog und H. Thoma:
Wie sicher ist der serologische Nachweis von Fremd-
eiweißen in Fleischerzeugnissen.
Fleischwirtschaft 55 (1975), 808
44. Hipp, N.J., M.L. Groves, J.H. Custer and T.L. McMeekin:
Separation of K-Casein.
J. Am. Chem. Soc. 72 (1950), 4928
45. Hitchcock, C.H.S., F.J. Bailey, A.A. Crimes,
D.A.G. Dean and P.J. Davis:
Determination of soya proteins in food using an
enzyme-linked immunosorbent assay procedure.
J. Sc. Food Agric. 32 (1981), 157
46. Hofmann, K., und J.F. Penny:
Eine Methode zur Identifizierung und quantitativen
Bestimmung von Fleisch- und Fremdeiweiß mit Hilfe
der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Flach-
gelen.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 254
47. Holpert, D.:
Zum histochemischen und immunhistochemischen Nach-
weis von Milcheiweiß in Brühwürsten.
Diss. med. vet., München 1965
48. Homayounfar, H.:
Bestimmung von Sojaprotein in Erzeugnissen auf
Fleischgrundlage mittels der Polyacrylamidgel-
Elektrophorese.
Fleischwirtschaft 57 (1977), 225

49. Hoog, P. de, S. van den Reek und F. Brouwer:
Nachweis und Bestimmung von aufgeschlossenen Milch-
eiweiß und Sojaprotein in Fleischerzeugnissen.
Fleischwirtschaft 50 (1970), 1663
50. Humphrey, J.H., und R.G. White:
Kurzes Lehrbuch der Immunologie.
3. Aufl.
Verlag Thieme, Stuttgart 1971
51. Jenness, R., und S. Patton:
Grundzüge der Milchchemie.
Bayer. Landwirtsch. Verlag, München-Basel-Wien 1967
S. 119, 133
52. Jübermann, O.:
Verteilen und Extrahieren.
In: Houben/Weyl: Methoden der organischen Chemie.
Bd. I/1.
Verlag Thieme, Stuttgart 1958, S. 223
53. Karlson, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und
Naturwissenschaftler.
5. Aufl.
Verlag Thieme, Stuttgart 1966, S. 47
54. Karrer, W.:
Lehrbuch der organischen Chemie.
13. Aufl.
Verlag Thieme, Stuttgart 1959
55. Keog, E.V., E.A. North and M.F. Warburton:
Hemagglutninines of the Hemophilus group.
Nature 160 (1947), 63
56. Kluge-Wilm, R.:
Serologischer Nachweis von Milcheiweiß in hocher-
hitzen Fleischwaren.
Diss. med. vet., Berlin 1967

57. Kotter, L., Ch. Herrmann und G. Corsico:
Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenen
Milcheiweiß in hochoerhitzten Fleischwaren mit Hilfe
der indirekten Hämagglutination.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 133 (1966), 15
58. Kotter, L., Ch. Herrmann, Ch. Ring und G. Corsico:
Untersuchungen zur Steigerung der Antikörperbildung
gegen erhitztes Eiweiß mittels Metallverbindung.
Zbl. Vet. Med. B 13 (1966), 613
59. Kotter, L., A. Palitzsch und Ch. Herrmann:
Technologische Bedeutung von Fremdeiweiß bei der
Fleischwarenverarbeitung.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 261
60. Kotter, L., H. Schulze und Ch. Herrmann:
Lebensmittelrechtliche Beurteilung von Fremdeiweiß-
zusätzen zu Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 263
61. Kotter, L., und Ch. Herrmann:
Die indirekte Hämagglutination als Nachweisreaktion
für Fremdeiweiße.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 267
62. Kraus, R., und S. Ludwig:
Über Bakteriohämagglutinine.
Wien. Klin. Mschr. 23 (1902), 120
63. Kutscher, W., W. Nagel und W. Pfaff:
Nachweis und quantitative Bestimmung von Milch-
eiweiß in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensm. Unters. 115 (1961), 117
64. Lehninger, A.D.:
Biochemie.
2. Aufl.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1981

65. Lindner, A.F., und A. Patschky:
Zum quantitativen Nachweis von Magermilchpulver in
Fleisch- und Wurstwaren.
Z. Lebensm. Unters. 74 (1937), 11
66. Menzel, E.J., und F. Glatz:
Die radioimmunologische Bestimmung von nativem und
hitzedenaturiertem Sojaprotein.
Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 172 (1981), 12
67. Miermeister, A.:
Nachweis und Bestimmung von Sojamehl in Wurstwaren.
Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 84 (1942), 392
68. Molander, E.:
Determination of soya protein in meat products by
standard curves obtained from SDS gel electrophoresis.
Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 174 (1982), 278
69. Müller, E.:
Houben/Weyl: Methoden der organischen Chemie.
Bd. I/1, Allgemeine Laboratoriumspraxis.
4. Aufl.
Verlag Thieme, Stuttgart 1958
70. Nash, A.M., and W.J. Wolf:
Solubility and ultracentrifugal studies on soybean
globulins.
Cereal Chem. 44 (1967), 183
71. Olsman, W.J., W.C.H. Houtepen und C. van Leeuwen:
Elektrophoretischer Nachweis von fleischfremden
Eiweißen in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 141 (1969), 253
72. Olsman, W.J.:
Persönl. Mitteilung an Dr. Ring, 1984

73. Osborne, T.B., and G.F. Campbell:
J. Am. Chem. Soc. 20 (1898), 419
74. Ouchterlony, Ö.
Diffusion in gel-methods for immunological analysis. I.
Progr. Allergy 5 (1958), 1
75. Ouchterlony, Ö.:
Diffusion in gel-methods for immunological analysis. II.
Progr. Allergy 6 (1962), 30
76. Oudin, J.:
La diffusion d'un antigene dans une colonne de gel
contenant les anticorps précipitants homologues.
Etude quantitative des trois principales variables.
Comptes rend. Acad. Sci. 228 (1949), 1890
77. Patterson, R.L.S., S.J. Jones and E.K. Kang'Ethe:
Immunological identification of meat species.
29. Europäischer Fleischforscher-Kongreß, Salso-
maggiore (Parma) 1983, Proceedings II, E 7, S. 657
78. Peltzer, J.:
Einige einfache chromatographische Verfahren für die
Lebensmittelkontrolle.
Mitt. GDCh Fachgr. Lebensmittelchemie u. gerichtl.
Chemie 11 (1957), 31, 109 und 12 (1958), 14
79. Quass, D.W.:
Soy protein products: Soy flour and grits.
Intern. Soy Protein Seminar, Warschau 1976
80. Reuße, U.:
Polarisiertes Licht - Eine Hilfe beim Nachweis von
Sojamehl in Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 22 (1971), 136

81. Ring, Ch.:
Vermehrte Bildung von Antikörpern gegen erhitztes
Eiweiß mittels Metallverbindungen.
Diss. med. vet., München 1964
82. Ring, Ch., P. Weigert und L. Hellmannsberger:
Zur Differenzierung von Eiweiß pflanzlichen und
tierischen Ursprungs mittels Disk-Polyacrylamid-
Gel-Elektrophorese.
Fleischwirtschaft 62 (1982), 648
83. Ring, Ch., und F. Sacher:
Zum quantitativen Nachweis von Sojaprotein in hoch-
erhitzten Fleisch-Erzeugnissen.
28. Europäischer Fleischforscher-Kongreß, Madrid 1982
84. Ring, Ch., und F. Sacher:
Quantitativer Nachweis von Sojaprotein in Brühwurst.
Modifikation der Indirekten Hämagglutination.
Fleischwirtschaft 64 (1984), 355
85. Rolle, M., und A. Mayr:
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
4. Aufl.
Verlag Enke, Stuttgart 1978
86. Roulet, D.I.A., M. Pein und G. von Muralt:
Immunoelektrophoretische Untersuchungen an Kuhmilch-
präparaten.
Milchwiss. 16 (1961), 415
87. Rund, K.F.:
Aufgeschlossenes viskoses Milcheiweiß.
Wertigkeit und Technologie.
Ernährungsind. 6 (1975), 4

88. Sacher, F.:
Zum quantitativen Nachweis von Sojaprotein in hoch-
erhitzten Fleisch-Erzeugnissen vom Typ Brühwurst.
Diplomarbeit, TU München 1982
89. Schumacher, K., und M. Kessler:
Quantitative Bestimmung von Serumproteinen durch
radiale Immundiffusion.
Z. klin. Chem. klin. Bioch. 6 (1968), 193
90. Schwick, H.G., K. Störiko und W. Becker:
Qualitative Plasmaprotein-Bestimmung durch Immun-
präzipitation.
Lab. Bl. med. Diagnostik Nr. 3, Behringwerke,
Frankfurt/M. 1971
91. Sinell, H.-J.:
Versuche zum biologischen Nachweis hitzedenaturierter
Muskelproteine.
Zbl. Vet. Med. B 8 (1961), 57, 101
92. Sinell, H.-J.:
Verarbeitung von Hühnereiweiß in Brühwurst.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 75 (1962), 48
93. Sinell, H.-J., und R. Kluge-Wilm:
Immunelektrophoretischer Nachweis von aufgeschlosse-
nem Milcheiweiß in erhitzten Fleischerzeugnissen und
Versuche zu einer quantitativen Auswertung.
Zbl. Vet. Med. B 15 (1966), 802
94. Sinell, H.-J.:
Probleme bei der Speziesidentifizierung von Pro-
teinen in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 121

95. Sinell, H.-J., und I. Mentz:
Serologische Speziesidentifizierung hitzedenaturierten Muskelproteins mittels Harnstoffextraktion.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 23 (1969), 55
96. Sinell, H.-J., und I. Mentz:
Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels Elektroimmunodiffusion.
Arch. Lebensmittelhyg. 26 (1975), 41
97. Spell, E.:
Nachweis von Milcheiweiß und Sojaeiweiß in Fleisch-
erzeugnissen mit Hilfe der vertikalen Flachdisc-
Elektrophorese.
Fleischwirtschaft 52 (1972), 1451
98. Stadelmann, W.:
Nachweis und quantitative Bestimmung von Milcheiweiß
in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensm. Unters. 117 (1962), 24
99. Stavitsky, A.B., and E.R. Arquilla:
Micromethods for the study of proteins and antigens.
J. Immunol. 74 (1955), 306
100. Stavitsky, A.B.:
Micromethods for the studies of proteins and
antibodies.
1. Procedure and general application of hemaggluti-
nation and hemagglutinationinhibition reactions
with tannic acid and protein treated red blood cells.
J. Immunol. 78 (1957), 380
101. Stutz-Baasch, M.:
Versuche zur Standardisierung des Nachweises von
aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen
mit Hilfe der Agglutination.
Diss. med. vet., München 1972

102. Thalacker, R.:
Die Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Dt. Lebensm. Rdsch. 59 (1963), 111
103. Thalacker, R.:
Der Einsatz der Dichtegradienten-Zentrifugation in
der Lebensmittelanalytik.
Dt. Lebensm. Rdsch. 59 (1963), 192
104. Thalacker, R.:
Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Mitt. GDCh Fachgr. Lebensmittelchemie u. gerichtl.
Chemie 17 (1963), 210
105. Thalacker, R.:
Abspaltung von Phosphoproteid-Phosphor bei aufge-
schlossenem Milcheiweiß durch Erhitzung.
Dt. Lebensm. Rdsch. 60 (1964), 211
106. Thalacker, R.:
Vereinfachtes Verfahren zur Ermittlung des Phospho-
proteid-Phosphors in Fleischerzeugnissen.
Mitt. GDCh Fachgr. Lebensmittelchemie u. gerichtl.
Chemie 20 (1966), 45
107. Thalacker, R.:
Über den Phosphoproteid-Phosphorgehalt einiger
Fleisch- und Wurstwaren.
Dt. Lebensm. Rdsch. 65 (1969), 373
108. Thaler, H., und A. Malzer:
Zur Bestimmung der Rohfaser nach K. Scharrer.
Z. Lebensm. Unters. 83 (1942), 141
109. Töpel, A.:
Chemie und Physik der Milch.
Fachbuchverlag, Leipzig 1981

110. Wadsworth, C., and L.A. Hanson:
Comperative analysis of immune electrophoretic precipitates employing a modified immune electrophoretic technique.
Int. Arch. Allergy 17 (1960), 165
111. Wagenstaller, G. Ch.:
Nachweis von Sojaprotein in hocharhitzten Fleisch-
erzeugnissen mit Hilfe der standardisierten indirekten
Hämagglutination.
Diss. med. vet., München 1972
112. Walker, D.B., F.E. Horan and R.E. Burket:
Engineered foods - the place for oilseed proteins.
Food Technol. 25 (1971), 813
113. Wardley, R.C., and I.R. Crowther:
The Elisa: Enzyme-linked immunosorbent assay in
veterinary research and diagnosis.
Nijhoff Publ., Den Haag/Boston/London, 1982
114. Williams, L.D., E.W. Meyer, G. Puski und W.W. Cravens:
Sojaprotein-Konzentrate und Sojaisolate.
Intern. Soy Protein Seminar, Warschau 1976
115. Wolf, W.J., and J.C. Cowan:
Soybeans as a food source.
Butterworths, London 1971
116. Wolf, W.J.:
What is soy?
Food Technol. 26 (1972), 44
117. Wreede, I. de, und H. Stegemann:
Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode in Natrium-
dodecylsulfat(SDS)-haltigen Lösungen.
Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 170 (1980), 14

118. N.N.:

Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz) vom 15. August 1974 (BGBl. I, S. 1946), i.d.F. vom 24.8.1976 (BGBl I, S. 2245, 2481)

119. N.N.:

Soja - vielfältiges Grundnahrungsmittel.

Lebensmittel-Praxis 32 (1980), H. 22 (Warenverkaufskunde; 1)

Herrn Professor Dr. Dr.h.c. L. Kotter danke ich für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Ratschläge und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr.Dr.habil. Ch. Ring für die Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. H. Schmidt und Herrn Akad. Dir. Dr. G. Krauß danke ich für wertvolle Hinweise.

Frau R. Hölzl und Frau M. Schmidt danke ich für technische Hilfeleistungen.

Lebenslauf

Geburtsdatum:	1. März 1953
Geburtsort:	Furth i. Wald
Vater:	Georg Roider
Mutter:	Erna Roider, geb. Riedl
1959 - 1964	Volksschule Furth i. Wald
1964 - 1973	Fraunhofer-Gymnasium Cham/Opf.
1973 - 1975	Wehrdienst
1976 - 1977	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
1977 - 1981	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Ab Januar 1982	Anfertigung der Dissertation am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
1982	Approbation als Tierarzt
Ab April 1983	Assistent bei Dr. H. Hohenstatt in Rötz/Opf.

